N° d'ordre 229

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES

par

Monique SENSENBRENNER

Licenciée ès-Sciences
Attachée de Recherches au Centre National de la Recherche Scientifique

PREMIÈRE THÈSE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA CONSTITUTION CHIMIQUE ET DU MÉTABOLISME DU BACILLE PROTEUS P 18 ET DES FORMES L STABLES QUI EN DÉRIVENT

DEUXIÈME THÈSE

Proposition donnée par la Faculté:

L'ACIDE RIBONUCLÉIQUE MESSAGER

Soutenues le 9 Juillet 1962 devant la Commission d'examen:

MM. G. OURISSON — Président
L. HIRTH, B. WURTZ — Examinateurs
E. AUBEL — Invité
Professeur honoraire à la Faculté des Sciences de Paris
P. MANDEL — Invité
Professeur à la Faculté de Médecine de Strasbourg

N° d'ordre 229

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES

par

Monique SENSENBRENNER

Licenciée ès-Sciences
Attachée de Recherches au Centre National de la Recherche Scientifique

PREMIÈRE THÈSE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA CONSTITUTION CHIMIQUE ET DU MÉTABOLISME DU BACILLE PROTEUS P18 ET DES FORMES L STABLES QUI EN DÉRIVENT

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

DEUXIÈME THÈSE

Proposition donnée par la Faculté :

L'ACIDE RIBONUCLÉIQUE MESSAGER

Soutenues le 9 Juillet 1962 devant la Commission d'examen :

MM. G. OURISSON — Président
L. HIRTH, B. WURTZ — Examinateurs
E. AUBEL — Invité
Professeur honoraire à la Faculté des Sciences de Paris
P. MANDEL — Invité
Professeur à la Faculté de Médecine de Strasbourg

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548001_0028

A MES PARENTS

En témoignage de profonde affection et de sincère reconnaissance pour leurs bienveillants conseils au cours de mes études, qui ont favorablement influencé le choix de ma carrière.

A NOTRE MAITRE

Monsieur le Professeur P. MANDEL

Conscient de ce que dans nos travaux de recherches nous devons à la constante sollicitude de cet éminent Maître, nous le prions de trouver ici l'hommage de notre respectueuse gratitude.

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

Doyen: Professeur J.-H. Vivien.

Doyens honoraires: A. Danjon, A. Kirrmann, P. Lacroute, H.-J. Maresquelle.

Professeurs honoraires: Ed. Bauer, P. de Beauchamp, L. Bounoure, A. Chrétien, H. Cartan, Cl. Chabauty, A. Danjon, J. Deny, Ch. Ehresmann, M. Frechet, G. Foex, H. Gault, L. Hackspill, A. Hée, Mme A. Hée, R. Hocart, A. Kirrmann, G. Lemée, P. l'Héritier, A. Lichnerowicz L. Néel, H. Ollivier, G. Ribaud, E. Terroine, R. Thiry, H. Villat, Et. Wolff.

Professeurs:

H. Weiss	T.	Physico-chimie des Hydrocarbures
G. Hugel	T.	Chimie du Pétrole
R. Bonnet	T.	Chimie biologique
H.-J. Maresquelle	T.	Biologie végétale
A. Roussel	T.	Calcul différentiel et intégral et Théorie des fonctions
H. Forestier	T.	Chimie générale
Ch. Sadron	T.	Physico-chimie Macromoléculaire
J. Rothé	T.	Physique du Globe
P. Lacroute	T.	Astronomie
J.-H. Vivien	T.	Zoologie et Embryologie expérimentale
L. Boisselet	T.	Chimie analytique du Pétrole
A. Maillard	T.T.P.	Chimie
S. Gorodetzky	T.	Physique générale et Physique nucléaire
L. Sackmann	T.T.P.	Mécanique des Fluides
J. Bye	T.	Chimie minérale et Chimie physique
R. Lombard	T.	Chimie organique
Mlle Perey M.	T.	Chimie nucléaire
Ph. Pluvinage	T.	Physique expérimentale
S. Goldsztaub	T.	Minéralogie et Pétrographie
P. Joly	T.	Biologie générale
H. Benoit	T.	Physique générale
J.-L. Koszul	T.	Topologie
P. Cuer	T.	Physique générale et Physique corpusculaire
G. Millot	T.	Géologie et Paléontologie
R. Lecolazet	T.T.P.	Physique du Globe
H. Saucier	T.T.P.	Minéralogie
R. Rohmer	T.T.P.	Chimie
Mlle Gillet S.	T.T.P.	Paléontologie
Mlle Gagnieu A.	T.T.P.	Botanique
R. Thom	T.	Analyse supérieure
S. Nikitine	T.	Physique générale
F. Stutinsky	T.	Physiologie générale
B. Wurtz	P.S.C.	Chimie biologique
J. Brenet	T.T.P.	Chimie physique
G. Ourisson	T.T.P.	Chimie
Fr. Stephan	P.S.C.	Zoologie
Cl. Levi	T.T.P.	Biologie générale
A. Coche	T.T.P.	Physique nucléaire

R. Cerf	T.T.P.	Physique
M. Berger	T.T.P.	Mathématiques
J. Frenkel	T.T.P.	Mathématiques
P. Taglang	T.	Physique
J.-P. Lonchamp	P.S.C.	Physique
J. Boscher	P.S.C.	Mécanique des Fluides
A. Deluzarche	T.T.P.	Chimie
J.-B. Donnet	T.T.P.	Chimie physique
R. Armbruster	P.S.C.	Physique
A. Roche	P.S.C.	Physique du Globe
L. Hirth	T.	Microbiologie
J. Yoccoz	T.	Physique théorique

Maîtres de Conférences:

J. Parrod	Chimie
A. Sigot	Zoologie
J. Cogne	Géologie
R. Wey	Chimie
J. Wucher	Physique
A. Fuchs	Mathématiques
Mme D. Magnac	Physique
Mme M. Brini	Chimie
A. Gallmann	Physique
M. Daune	Physique
J.-P. Adloff	Chimie nucléaire
P. Miahle	Physiologie animale
J. Gremillard	Mathématiques
G. Perny	Physique
J. Levisalles	Chimie
D. Bernard	Méthodes Mathématiques de la Physique
R. Baro	Physique
G. Lapraz	Botanique
H. Danan	Physique
M. Zisman	Mathématiques
E. Daniel	Physique
F. Norguet	Mathématiques
P. Chevallier	Physique
J. Leray	Physique
H. Duranton	Botanique
R. Weiss	Chimie
P. Cartier	Mathématiques

Secrétaire: G. Saint-Pé.

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS 15

INTRODUCTION 17

Première partie: METHODES.

I. *Méthodes microbiologiques.*

A. — Microorganismes 21
B. — Milieu de culture 21
C. — Contrôle des cultures 22
D. — Culture des formes L en surface 22
E. — Obtention de colonies L 22
F. — Obtention des formes L reversibles 22

II. *Méthodes chimiques.*

A. — Opérations préliminaires 23
1) Récolte des microorganismes 23
2) Elimination des composés acido-solubles 23
3) Extraction des lipides et détermination du résidu protéidique 24

B. — Séparation des acides nucléiques 24
C. — Purification des nucléotides par passage sur charbon 25
D. — Dosages 25

1) Dosage du phosphore 25
2) Dosage de l'azote 25
3) Dosage du ribose 25
4) Dosage du désoxyribose 26

III. *Détermination de la composition en bases azotées de l'A.R.N. et de l'A.D.N.*

A. — Séparation quantitative des ribonucléotides par chromatographie sur papier 26

B. — Electrophorèse à haute tension pour la séparation des ribonucléotides 26

C. — Méthode chromatographique pour la détermination quantitative de la composition en bases de l'A.D.N. .. 27

IV. *Technique de mesure de quelques activités métaboliques*

A. — Détermination de la consommation d'oxygène 27
B. — Détermination de l'activité aldolasique 28
C. — Détermination des activités déshydrogénasiques 28

V. *Emploi de phosphore radio-actif* 29

VI. *Présentation des résultats* 31

Deuxième partie: RECHERCHES PERSONNELLES.

I. *Etude des cultures de formes L stables.*

A. — Mise au point d'une méthode de culture des formes L 33
B. — Etude morphologique de diverses cultures de formes L 36
C. — Cinétique de la croissance du Bacille Proteus P18 et des formes L 39
D. — Fractionnement d'une culture de formes L en ses diverses espèces morphologiques 42
1) Méthode 42
2) Répartition des F.L de diverses tailles dans les fractions 51
3) Etude comparée du pouvoir de prolifération des diverses fractions 52

II. *Constitution chimique globale du Bacille Proteus P18 et des formes L stables*

A. — Détermination quantitative de la teneur en lipides, en protéides et en acides nucléiques du Proteus P18 et des formes L en phase stationnaire 55
1) Détermination quantitative de la teneur en lipides 56
2) Détermination quantitative de la teneur en protéides 56
3) Détermination quantitative de la teneur en acides nucléiques 58
B. — Détermination quantitative de la teneur en acides nucléiques, en protéides et en lipides du Proteus P18 et des formes L au cours de la croissance 61

III. *Etude comparée des teneurs en A.R.N. et en A.D.N. d'un élément microbien* 65

IV. *Etude de la composition de l'ensemble des acides ribonucléiques et de l'acide désoxyribonucléique du Bacille Proteus P18 et des formes L stables:*

A. — Etude de la répartition des ribonucléotides de l'A.R.N. 67
1) Etude comparée de l'A.R.N. du Proteus et des F. L cultivées en surface (culture en voile) 68
2) Etude comparée de l'A.R.N. du Proteus et des diverses fractions des F.L cultivées en suspension dans le milieu hypertonique 68

B. — Répartition des bases puriques et pyrimidiques de l'acide désoxyribonucléique 69

V. *Etude du métabolisme des acides nucléiques du Bacille Proteus P18 et des formes L stables:*

A. — Action du phosphore radio-actif sur le Bacille Proteus P18 71

B. — Etude de l'incorporation de ^{32}P dans le Proteus P18 et les formes L en phase stationnaire 72

C. — Etude du renouvellement des acides nucléiques du Proteus P18 et des formes L pendant la phase stationnaire 75

VI. *Etude de quelques activités métaboliques du Bacille Proteus P18 et des formes L stables:*

A. — Etude de la consommation d'oxygène 76

B. — Etude de quelques activités enzymatiques:

1) Activité aldolasique 77

2) Activités déshydrogénasiques 78

Troisième partie: DISCUSSION.

I. *Etude morphologique des formes L:*

A. — La culture des formes L en milieu hypertonique 80

B. — Le fractionnement des formes L 82

C. — Le pouvoir de prolifération des diverses formes morphologiques 83

II. *Constitution chimique des formes L* 85

III. *Renouvellement des acides nucléiques et de leurs précurseurs* 95

IV. *Métabolisme des formes L* 96

Résumé et conclusions 99

Bibliographie 107

ABREVIATIONS UTILISÉES

A	adénine
A.D.N.	acide désoxyribonucléique
AMP	acide adénylique: 2′ et 3′ adénosine monophosphates
A.N.	acide nucléique
A.R.N.	acide ribonucléique
A.S.	activité spécifique (coups/min./μg P)
C	cytosine
C.E.	culture entière de formes L
c/min.	coups par minute
CMP	acide cytidylique: 2′ et 3′ cytidine monophosphates
D.O.	densité optique
F.D.P.	fructose-1,6-diphosphate
F.L	formes L
F.L totales	culture entière de formes L contenant les divers types morphologiques
Fr.	fraction (diverses espèces morphologiques des formes L)
g	accélération due à la pesanteur
G	guanine
GMP	acide guanylique: 2′ et 3′ guanosine monophosphates
Nbre Exp.	nombre d'expériences
PPLO	organismes du type responsable de la péripneumonie
T	thymine
T.T.C.	chlorure de 2, 3, 5 triphényl-tétrazolium
UMP	acide uridylique: 2′ et 3′ uridine monophosphates

AVANT-PROPOS

Les recherches qui constituent le présent travail ont été effectuées de 1955 à 1961 à l'Institut de Chimie Biologique de la Faculté de Médecine de Strasbourg.

Sous l'impulsion de Monsieur le Professeur P. MANDEL, Directeur de cet Institut, qui a bien voulu nous accueillir dans son laboratoire et nous y faire profiter de sa vaste expérience, nos recherches furent spécialement orientées vers l'étude de la biochimie des microorganismes. Nous en restons profondément reconnaissante à cet éminent Maître.

Cette étude nous conduisit à nous familiariser avec les techniques bactériologiques et à effectuer, à cet effet, un stage de six mois chez Monsieur le Professeur R. TULASNE, dont les connaissances et conseils nous furent d'une grande utilité. Il nous a aimablement fourni la souche de Proteus P18 et les formes L qui en dérivent, ce qui nous a permis d'entreprendre notre travail de recherches. Qu'il veuille bien trouver ici-même l'assurance de notre entière reconnaissance.

Notre reconnaissance s'adresse tout particulièrement à Monsieur le Professeur E. AUBEL pour le précieux parrainage qu'il nous a prodigué pendant plusieurs années et la bienveillance qu'il nous a sans cesse témoignée. Nous le remerçions vivement pour sa participation à notre jury de thèse.

Nous remercions également Messieurs les Professeurs G. OURISSON, L. HIRTH et B. WURTZ d'avoir bien voulu nous faire l'honneur d'examiner et de juger le présent travail.

Nous tenons à remercier notre Maître, Monsieur le Professeur R. BONNET pour son enseignement de haute qualité et pour les conseils éclairés qu'il nous a prodigués au cours de notre travail.

Un bref séjour au laboratoire de Monsieur le Professeur J. ROUX, à la Faculté de Médecine de Montpellier a avantageusement complété nos recherches dans le domaine particulier de la micromanipulation et nous tenons à exprimer à Monsieur le Professeur ROUX notre très vive gratitude.

La réalisation du présent travail est en grande partie le fruit d'une collaboration étroite avec les Docteurs T. TERRANOVA, F. FEO et P. de GREGORIO, dont les vastes connaissances bactériologiques et biochimiques ont grandement facilité notre tâche. Qu'ils trouvent dans ce travail un modeste témoignage de notre reconnaissance et l'assurance de nos sentiments amicaux.

Notre amie, Mademoiselle A.-M. BADER, Licenciée ès-Sciences, est notre collaboratrice depuis 1958. Elle s'est associée avec dévouement à la réalisation de notre travail et sa collaboration demeurera pour nous un durable souvenir.

Monsieur R. ROSENBERG, Ingénieur-Docteur, nous a apporté une aide précieuse et nous l'en remercions vivement.

Que Madame L. MANDEL, Docteur en Médecine, Docteur ès-Sciences, veuille bien trouver ici toute notre gratitude pour la sympathie et la prévenance qu'elle nous a toujours dispensées.

Nous remercions Mademoiselle M. JACOB, Docteur ès-Sciences, Monsieur J. WEILL, Docteur en Médecine, Docteur ès-Sciences, et Monsieur R. BIETH, Docteur ès-Sciences, dont les conseils nous furent très précieux.

Nous associons dans une même pensée de reconnaissance Mademoiselle C. SCHMITT, notre collaboratrice technique, dont le zèle a été au-dessus de tout éloge.

Enfin notre gratitude s'adresse à Monsieur J. KEMPF, Docteur en Médecine, et à Monsieur F. WOLFF qui ont aimablement prêté leur concours pour la réalisation des photos aux microscopes optique et électronique et ont ainsi contribué à l'achèvement de ce travail.

Nous associons enfin, dans une même pensée amicale, chercheurs et techniciens de l'Institut de Chimie Biologique qui ont contribué, de près ou de loin, à mener à bien ce travail.

Notre reconnaissance s'adresse également au C.N.R.S., qui, par ses allocations, a rendu possible ce travail de recherches.

Nous remercions le Laboratoire de Recherches de la Clinique Sainte-Anne à Strasbourg qui a mis à notre disposition un appareillage nécessaire à nos travaux.

INTRODUCTION

On désigne sous le terme général de formes L «les éléments globuleux, issus de bactéries dont la paroi a été modifiée ou éliminée complètement par des facteurs divers, et susceptibles de se multiplier sur des milieux solides en donnant naissance à des colonies» (Tulasne et coll. [108]). Il y a lieu de distinguer deux types de formes L (F.L) (Dienes et Weinberger [17]): les F.L du type A, qui ne peuvent plus réverser vers la bactérie normale, ce sont les F.L stables; les F.L du type B, qui sont capables de redonner des bactéries, ce sont les F.L réversibles.

Depuis la découverte des F.L en 1935 par Klieneberger (45), de nombreux auteurs ont étudié les caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques de ces microorganismes. Les premières recherches, comportant uniquement des études morphologiques descriptives et sérologiques, sont consignées dans trois revues générales (Klieneberger-Nobel [46]; Dienes et Weinberger [17]; Tulasne [104]). La transformation de la bactérie en F.L, la multiplication de ces organismes, la réversion vers la forme normale, ont fait l'objet de nombreux travaux et des hypothèses concernant l'importance respective des diverses espèces morphologiques des F.L ont été formulées (Tulasne [106]; Minck et Lavillaureix [72]; Liebermeister et Kellenberger [56]; Kellenberger et coll. [43]; Klieneberger-Nobel [47]; Terranova [102]; Klieneberger-Nobel [48]; Taubeneck [101]; Kandler et Kandler [37]).

Pour les études morphologiques et la détermination des caractères physiologiques des F.L, ces dernières étaient le plus souvent cultivées sur gélose molle, contenant presque toujours du sérum de cheval et de la pénicilline. A cause de leur fragilité osmotique, il était difficile de cultiver ces formes en milieu liquide. En prenant certaines précautions, quelques auteurs ont pu repiquer des F.L, initialement obtenues sur milieu solide, en milieu liquide (Tulasne et coll. [109]; Dienes [16]; Abrams [1]; Gilmore et Burnett [23]; Altenbern et Landman [2]). Cependant, la méthode de culture selon Tulasne en voile fin à la surface de bouillon nutritif, ne fournit que 1 mg de substance sèche par tube à essais ensemencé. D'autre part, au cours du prélèvement des microorganismes, on ne peut éviter des pertes assez importantes. Dans les cultures étudiées par Abrams, la pousse n'apparaît qu'entre le 3e et le 7e jour d'incubation, ce qui conduit à travailler sur des microorganismes âgés. De plus, ces cultures sont constituées essentiellement par de petites formes granu-

laires; les grandes formes globuleuses sont rares. Les techniques de culture de Gilmore et Burnett et d'Altenbern et Landman sont postérieures à la nôtre, publiée en 1957 et que nous exposerons plus loin. Gilmore et Burnett n'obtiennent après le premier repiquage qu'un léger trouble au bout de 7 à 14 jours, et à l'observation microscopique la suspension présente presque uniquement des éléments granulaires. Altenbern et Landman sélectionnent sur gélose des mutants de colonies L 3B, capables de se multiplier dans du bouillon nutritif contenant sérum de cheval et succinate de sodium 0,3M. La phase de latence dure 24 à 48 heures et ensuite la phase active de croissance se poursuit pendant 7 jours d'incubation. Ce sont des délais très longs. D'autre part, dans la phase stationnaire, la culture est essentiellement constituée par de grandes formes globuleuses.

Les méthodes de culture des F.L en milieu liquide évoquées plus haut, s'adaptent parfaitement aux études morphologiques et immunologiques. Elles s'avèrent cependant très laborieuses quand il s'agit de préparer des quantités appréciables de F.L. C'est sans doute la raison pour laquelle il existe très peu de données biochimiques concernant ces formes microbiennes. Aussi pour aborder dans de bonnes conditions une étude biochimique, nécessitant des quantités importantes de microorganismes, nous avons été amenée à mettre au point une nouvelle méthode de culture des F.L que nous rapporterons au chapitre «Recherches personnelles». Parallèlement, Kandler et coll. (40) proposaient un autre milieu liquide de culture, qui exige cependant une phase de latence plus longue et fournit, comme nous allons le voir, des F.L pauvres en A.R.N. De même, plus récemment, Panos et Barkulis (78) ont cultivé des F.L en milieu liquide pour effectuer une analyse des constituants chimiques de ces microorganismes. Mais le rendement de leur méthode est inférieur à celui que nous obtenons, ainsi que nous le montrerons plus loin.

Les F.L constituent une population hétérogène, comprenant des formes géantes de 15 à 25 μ de diamètre, des formes de taille intermédiaire (4 à 5 μ) et des formes naines, dont les plus petites ont un diamètre d'environ 250 mμ (Tulasne [106]; Tulasne et Lavillaureix [107]). Jusqu'à présent, seules les formes naines ont pu être isolées des cultures totales de F.L par ultra-filtration. Ces éléments ont fait l'objet de nombreux travaux concernant leur viabilité (Vilas et coll. [114]; Carrère et coll. [11]; Tulasne [106]; Hopken et Bartmann [30]; Kellenberger et coll. [43] Vigouroux et Hannoun [113]; Roux [88]; Tulasne et coll. [108]). Les résultats obtenus ont été très discutés. Les quelques recherches effectuées concernant la constitution chimique et le métabolisme des F.L n'ont porté que sur des cultures entières de ces microorganismes. Etant donné l'hétérogénéité des cultures de F.L, il nous a paru intéressant de chercher à séparer les diverses espèces morphologiques, afin de pouvoir les étudier séparément du point de vue biochimique. Nous avons mis au point

une technique permettant, à l'aide de centrifugations différentielles, de fractionner une culture de F.L en ses éléments de tailles différentes.

Les travaux biochimiques sur les F.L sont peu nombreux. Quelques auteurs se sont intéressés à la question de la paroi bactérienne chez les F.L, car ces organismes en sont partiellement ou totalement dépourvus (Sharp et coll. [92]; Kandler et coll. [38]; Weibull [118]; Sharp et Dienes [91]). Ils ont montré que certains constituants de la paroi sont, soit en quantité moindre (F.L réversibles), soit inexistants (F.L stables).

En 1941, Partridge et Klieneberger (81) ont démontré la présence de cholestérol dans les cultures de F.L. Les premières observations sur la teneur globale en protéines, en lipides et en acides nucléiques des F.L ont été faites par Vendrely et Tulasne (111, 112) qui ont trouvé des différences notables entre la bactérie et les F.L. Depuis que nous avons abordé nos travaux et parallèlement à nos premières données, Kandler et coll. (40) ont exposé les résultats des variations de la teneur en acides nucléiques chez la forme bactérienne et les F.L stables qui en dérivent, au cours de la croissance. Ils en ont également déterminé la teneur en phosphore lipidique. Ces auteurs ont constaté qu'il existe des écarts assez sensibles dans le taux des divers constituants chimiques de ces microorganismes. Jungermann et Pogonowska (34) ont étudié des F.L de quelques souches de la famille des Enterobacteriaceae en phase stationnaire, comparant leurs propriétés chimiques et antigéniques à celles de la bactérie normale. La chromatographie des sucres a montré une composition qualitative des polysaccharides indentique pour les F.L et la forme bactérienne. Des différences existeraient cependant dans la répartition quantitative. L'analyse chromatographique des acides aminés montre la présence des principaux acides aminés dans les deux microorganismes. L'existence de proline a été démontré dans les F.L, mais non dans la bactérie. Ces auteurs ont également effectué des déterminations d'azote total et de phosphore total et trouvent une différence entre les deux formes microbiennes. Panos et coll. (79) ont déterminé quantitativement certains composés polysaccharidiques, la teneur en acides aminés et la quantité d'acides nucléiques de formes normales et de F.L d'une souche de Streptococcus. Ces auteurs signalent une diminution importante de la teneur en glucosamine, en rhamnose et en acide muramique dans les F.L. En ce qui concerne la composition en acides aminés, l'ornithine est inexistante dans ces microorganismes; les autres acides aminés y sont présents en quantités plus ou moins importantes. Aucune différence significative n'a été trouvée entre la bactérie et les F.L dans leurs teneurs totales en azote protéique et en acides nucléiques. Weibull et Beckman (119) ont entrepris une étude comparative de certains constituants chimiques (protéines, lipides et A.N.) d'une souche de Proteus et de sa F.L au cours de la croissance et ne

trouvent pas de différence notable entre les deux. Récemment, dans notre laboratoire, Rebel et coll. (83) ont analysé la répartition des lipides dans une souche de Proteus et des F.L qui en dérivent. Ils ont constaté dans les F.L un accroissement du taux relatif des stérols et des phospholipides et une diminution de celui des glycolipides.

Le métabolisme des F.L a également fait l'objet de quelques rares études. Minck (70), Kandler et Kandler (35, 36), Kwiatowski et coll. (50) ont étudié la fermentation des sucres, la réduction des nitrates en nitrites, la production d'H_2S et d'indol, l'activité catalasique et le pouvoir réducteur. Les F.L possèdent d'après ces critères à peu près le même équipement enzymatique que les formes normales, mais les réactions enzymatiques semblent se déclencher plus lentement et sont moins intenses. Cependant, le pouvoir de liquéfier la gélatine que possède la bactérie étudiée n'existe pas pour la F.L correspondante. Dans notre laboratoire, Mandel et Terranova (63) ont mis en évidence une diminution de la consommation d'oxygène et de la production d'acide lactique chez les F.L stables d'une souche de Proteus. Ces résultats ont été confirmés par Kandler et coll. (40). Par contre, l'utilisation de certains substrats, tels que des acides organiques et des acides aminés, ainsi que l'étude de la sensibilité vis-à-vis d'inhibiteurs de la respiration, n'a montré aucune différence entre la F.L et la bactérie (Kandler et coll. [39]). Dans une note préliminaire, Weibull et Beckman (120) examinent le métabolisme des formes naines, isolées de F.L stables d'un Proteus en utilisant la technique de fractionnement que nous avons décrite en 1957. Ils concluent à l'absence d'une différence fondamentale entre les formes naines et la culture totale des F.L.

Toutes ces études biochimiques sur les F.L que nous venons de citer fournissent un aperçu très incomplet de la constitution et du métabolisme de ces microorganismes, qui sont traités globalement et dans la plupart des cas sans tenir compte de la phase de croissance. Il nous a donc paru intéressant d'examiner d'une manière plus approfondie la constitution chimique et le métabolisme des F.L totales et de leurs diverses espèces morphologiques. Compte tenu des résultats acquis, nous avons également cherché à préciser la biologie du cycle évolutif de ces formes sur lequel différentes hypothèses ont été formulées (Klieneberger-Nobel [46]; Dienes et Weinberger [17]; Tulasne [104]; Kellenberger et coll. [43]).

Dans ce travail, nous allons d'abord exposer nos méthodes originales de culture des F.L en milieu hypertonique et de fractionnement de ces organismes en leurs diverses espèces morphologiques. Ensuite, nous comparerons la constitution chimique de la bactérie normale et des F.L stables de diverses tailles qui en dérivent. Nous étudierons enfin quelques aspects métaboliques de ces microorganismes.

Comme d'habitude, les résultats de chaque étude posent de nouveaux problèmes que nous espérons aborder ultérieurement.

PREMIERE PARTIE

METHODES

I. MÉTHODES MICROBIOLOGIQUES

A. — MICROORGANISMES.

Nos expériences ont porté sur la souche Proteus P 18 et les F.L stables qui en dérivent. Cette souche nous a été donnée par le Professeur Tulasne. Nous avons déterminé quelques caractères biochimiques du bacille Proteus P 18: il fermente le glucose avec une production faible de gaz, par contre il n'attaque ni le maltose, ni le lactose; il élabore de l'uréase; il dégage une quantité importante d'H_2S et ne produit pas d'indole. Cette souche possède les propriétés du Proteus mirabilis. La bactérie normale, comme tous les microbes du genre Proteus, à la forme d'un bâtonnet mobile, Gram négatif. Les F.L du Proteus P 18, ensemencées sur milieu solide, donnent naissance aux colonies L caractéristiques.

Quelques essais ont porté sur des F.L réversibles que nous avons préparées, afin de suivre la réversion vers la bactérie normale.

B. — MILIEU DE CULTURE.

Nous avons utilisé du bouillon DIFCO nutritif «Heart infusion broth» de composition suivante:

Infusion de cœur de bœuf	500 g
Bacto-Tryptose	10 g
ClNa	5 g
(pH 7,4)	

Pour rehydrater le milieu, on dissout 25 g de poudre dans 1.000 ml d'eau distillée et on stérilise pendant 20 minutes dans l'autoclave à 115° C. Pour les cultures de F.L en suspension, on ajoute au milieu du saccharose à une concentration finale 0,3 M.

Pour la préparation du sérum de cheval, le sang de cheval est prélevé stérilement à l'abattoir; on laisse le caillot de sang se former pendant 12 heures à 0° C; on décante le sérum et on le stérilise par filtration sur filtre Seitz Gr. 14.

Nous avons utilisé la pénicilline «G» fournie par les Laboratoires Roussel. Bien que nous travaillions sur des F.L stables, nous avons toujours ajouté de la pénicilline à notre milieu de culture, afin d'éviter les contaminations.

C. — CONTROLE DES CULTURES.

La souche de Proteus P 18 est contrôlée régulièrement par agglutination par de l'anti-sérum que nous avons préparé à partir de cette souche. Les cultures de F.L sont examinées au microscope à contraste de phase.

D. — CULTURE DES FORMES L EN SURFACE.

Nos premiers essais ont porté sur les F.L stables cultivées en surface («voile») selon la méthode de Tulasne et coll. (109). Le voile, constitué par les divers éléments des F.L englobés dans une substance visqueuse, est repiqué dans une série de tubes à essais contenant 5 ml de bouillon nutritif, 1 ml de sérum de cheval et 10.000 U. de pénicilline. A l'aide d'une öse on prélève un fragment de voile et on le dépose à la surface du milieu de culture. Les cultures sont incubées à 37° C. Le fragment de voile croît et envahit au bout de 5 à 6 jours toute la surface du bouillon. Les cultures en surface ne fournissent que des faibles quantités de microorganismes. Ces quantités suffisantes pour des études morphologiques ne l'étaient plus pour les études biochimiques que nous voulions entreprendre. Il aurait été nécessaire de multiplier considérablement le nombre de tubes d'ensemencement ou de prolonger la durée des cultures, ce qui aurait conduit à travailler sur des cultures âgées contenant des produits d'autolyse. C'est la raison pour laquelle nous avons mis au point une méthode de culture, permettant facilement de recueillir des quantités importantes de F.L. Les détails de cette technique seront exposés dans le chapitre concernant nos recherches personnelles.

E. — OBTENTION DE COLONIES L.

Nous avons ensemencé en double couche selon la méthode de Gratia (25). A 2,5 ml de bouillon gélosé à 2 p. 100 fondu et maintenu à une température voisine de 40° C on ajoute 0,5 ml de sérum de cheval et 2.500 U. de pénicilline; puis on y ajoute la suspension microbienne. Ce mélange est aussitôt versé à la surface d'une couche épaisse de gélose nutritive solide en boîte de Petri. Les boîtes sont scellées à la paraffine et placées à l'étuve à 37° C. Après 2 à 3 jours des colonies L apparaissent.

F. — OBTENTION DES FORMES L REVERSIBLES.

Pour certaines expériences, nous avons cultivé des F.L réversibles en nous inspirant de la technique de Dienes (16), que nous avons légèrement modifié. Le bacille Proteus P18 est ensemencé en boîte de Petri contenant 10 ml de bouillon gélosé à 2 p. 100, 2 ml de sérum

de cheval et 10.000 U. de pénicilline. Les boîtes de PETRI sont ensuite scellées à la paraffine et mises à l'étuve à 37° C. Après 4 à 5 jours, de nombreuses colonies L apparaissent sur la gélose. A ce moment, ces colonies sont recouvertes par 10 ml de bouillon nutritif saccharosé (0,3 M), contenant 2 ml de sérum et 10.000 U. de pénicilline; les cultures sont remises à l'étuve pendant 24 heures. Au bout de ce délai, on recueille les F.L qui se trouvent en suspension dans le milieu liquide. Ces F.L sont réversibles: en les réensemençant dans du bouillon ne contenant pas de pénicilline, elles réversent vers la bactérie normale.

II. MÉTHODES CHIMIQUES

A. — OPERATIONS PRELIMINAIRES.

1° Récolte des microorganismes.

Les microorganismes sont recueillis par centrifugations rapides à l'ultracentrifugeuse SPINCO L et lavés deux fois avec une solution glacée de NaCl à 9 p. 1000 qui respecte l'intégrité des formes osmotiquement fragiles. Les bactéries sédimentent après 10 minutes à 20.000 g. Pour obtenir le culot de la totalité des F.L, il convient de centrifuger 1 heure à 75.000 g comme nous allons le montrer dans le chapitre concernant les recherches personnelles.

La solution de NaCl à 9 p. 1000 a été choisie après une étude de la résistance osmotique des F.L à des solutions de NaCl à diverses concentrations faite par TERRANOVA et DE GREGORIO (103). D'autre part nous avons expérimentalement vérifié que la solution de NaCl à 9 p. 1000 maintient l'intégrité des F.L. Pour cela, des échantillons de F.L sont lavés soit avec une solution de saccharose 0,3 M, soit avec une solution de NaCl à 9 p. 1000, puis sont réensemencés en bouillon hypertonique et sur gélose molle. On détermine la prolifération et la viabilité de ces F.L par mesure de la turbidité en milieu liquide et par comptage des colonies L obtenues sur milieu solide. Les expériences effectuées avec les F.L traitées par les solutions de saccharose et de chlorure de sodium ont donné des résultats identiques. Nous avons également vérifié, en mesurant la densité optique à 2.600 et 2.800 Å et en dosant le potassium sur les liquides de lavages, que toute trace de milieu de culture a été éliminée sans qu'il y ait eu de perte de substance microbienne.

2° Elimination des composés acido-solubles.

Pour obtenir une meilleure extraction des substances acido-solubles, nous avons partiellement détruit la paroi bactérienne en broyant les bactéries dans 10 ml d'éther froid pour 2 à 3 g de poids frais. Après évaporation de l'éther avec un courant d'air froid, nous

avons procédé à l'extraction des substances acido-solubles avec une solution d'acide trichloracétique à 7 p. 100. Nous avons toujours opéré à 0° C en faisant trois lavages. Le résidu acido-insoluble est lavé une fois à l'eau glacée et une fois à l'alcool à 95°, afin d'éliminer l'acide trichloracétique restant.

3° **Extraction des lipides et détermination du résidu protéidique.**

Pour la délipidation de nos microorganismes, nous avons employé la méthode de Folch et coll. (22). Les lipides sont extraits par un mélange chloroforme-méthanol (2/1 en volume). Le résidu délipidé est séché à la température de 60° C. Par pesée, on obtient le poids des protéines associées aux nucléo-protéines: soit la valeur des protéides.

Détermination des lipides totaux.

Dans les cas où nous nous sommes attachés à l'étude des lipides, nous avons procédé à leur extraction selon Folch avant de faire celle des substances acido-solubles.

Les solvants contenant les lipides sont recueillis, puis évaporés à sec à 60° C sous vide et repris deux fois par le benzène à chaud 10 minutes au bain-marie bouillant. Après centrifugation, on recueille le benzène contenant les lipides dans de petits pèse-filtres tarés, on évapore le benzène et par pesée on détermine le poids des lipides. Ceux-ci peuvent ensuite être redissous dans le benzène et on peut doser le phospore lipidique par la méthode de Briggs (9) (voir plus loin).

B. — SEPARATION DES ACIDES NUCLEIQUES.

Les acides ribo- et désoxyribonucléiques sont séparés selon le procédé de Schmidt et Thannhauser (90). Les microorganismes, après élimination des substances acido-solubles et délipidation sont soumis à une hydrolyse alcaline soit avec de la soude 0,5 N, soit avec de la potasse 0,5 N, en employant 2 ml de solution d'alcali pour 20 mg de substance délipidée, ce qui correspond à environ 200 µg de P ribonucléique. Après 15 heures à 37° C, l'A.R.N. est dégradé en nucléotides acido-solubles, alors que l'A.D.N. et les protéines restent acido-insolubles. En acidifiant l'hydrolysat, l'A.D.N. est précipité en même temps que les protéines. Nous avons adopté un mélange acidifiant, d'usage dans notre laboratoire, de composition suivante: acide perchlorique 0,5 N (5 volumes) — acide chlorhydrique 6 N (1 volume). Pour 1 volume d'hydrolysat, il faut 1,2 volumes du mélange acidifiant. Le précipité est déposé par une centrifugation de 10 minutes à 35.000 g. Le liquide surnageant contient les nucléotides de l'A.R.N. Du précipité, on extrait les oligonucléotides de l'A.D.N. en traitant le culot par l'acide perchlorique N pendant deux fois 30 minutes à 80° C avec agitation continue. L'extraction est effectuée avec 2 ml d'acide per-

chlorique N pour 10 mg de substance délipidée. Après centrifugation, on recueille le surnageant qui contient les produits de dégradation de l'A.D.N.

C. — PURIFICATION DES NUCLEOTIDES PAR PASSAGE SUR CHARBON.

Nous avons utilisé la méthode employée dans notre laboratoire, permettant de séparer les nucléotides des composés phosphorés non nucléiques (54, 123). Les nucléotides sont fixés sur charbon «activé», alors que les autres composés sont éliminés. Les nucléotides peuvent ensuite être élués quantitativement. Cette technique a été utilisée pour une étude globale des hydrolysats alcalins d'A.R.N. et pour l'étude des nucléotides libres de la fraction acido-soluble.

D. — DOSAGES.

1° Dosage du phosphore.

Le dosage des ions phosphates est basé sur leur transformation en phosphomolybdate qui donne une coloration bleue en présence d'un réducteur.

Pour le dosage de 20 à 40 µg de P, nous avons utilisé la méthode de Bell et Doisy (4), modifiée par Briggs (9) et par Machebœuf et Delsal (61). Pour des quantités faibles de P (2 à 10 µg), la technique de Chen et coll. (13) a été employée.

La courbe d'étalonnage est établie à l'aide d'une solution de phosphate monopotassique. Une unité de D.O. correspond à 68 µg de P pour la méthode de Machebœuf et Delsal et à 17,3 µg de P pour celle de Chen et coll.

2° Dosage de l'azote.

Nous avons déterminé l'azote protéidique par dosage colorimétrique à l'aide du réactif de Nessler après kjeldhalisation.

La courbe de référence est faite avec une solution de sulfate d'ammonium. A une D.O. de 0,100 correspondent 18,9 µg d'azote.

3° Dosage du ribose.

En milieu acide bouillant, les pentoses se transforment en furfural. Ce dernier donne une coloration avec les phénols en présence de perchlorure de fer, ce qui permet sa détermination quantitative.

Nous avons dosé le ribose de l'A.R.N., soit par la technique de Mejbaum (69) à l'orcinol, soit par la technique de Dische et Borenfreund (19) au phloroglucinol.

La courbe de référence est établie avec de l'A.R.N. de levure purifié selon Smith et Markham (96). Dans nos conditions expérimentales une unité de D.O. correspond à 19 µg et à 60 µg de P ribonucléique respectivement pour les techniques à l'orcinol et au phloroglucinol. Rappelons que pratiquement seul le ribose des nucléotides puriques est dosable par cette méthode. Notons que le rapport des nucléotides puriques aux nucléotides pyrimidiques des microorga-

nismes étudiés est très voisin de celui de l'A.R.N. de levure servant à l'étalonnage. De plus nos études ayant essentiellement un caractère comparatif, il importait avant tout de garder toujours la même base de référence.

4° **Dosage du désoxyribose.**

Le désoxyribose est transformé au bout de 17 heures à la température du laboratoire en milieu acétique-sulfurique en aldéhyde lévulique. Ce dernier réagit avec la diphénylamine en donnant une coloration bleue. Pour la détermination quantitative du désoxyribose, nous avons utilisé le procédé de DISCHE (18), modifié par BURTON (10), qui permet d'éliminer les causes d'erreur dues à des substances autres que l'A.D.N. La réaction se fait en milieu acide perchlorique 0,5 N. L'extraction de l'A.D.N. étant effectuée par l'acide perchlorique N, nous avons toujours dilué de moitié notre extrait.

La courbe de référence est établie avec de l'A.D.N. de thymus de veau purifié selon KAY et coll. (42). Une unité de D.O. correspond à 25 µg de P désoxyribonucléique. Rappelons que seul le désoxyribose des nucléotides puriques réagit. D'après les travaux de CHARGAFF, le rapport des bases puriques aux bases pyrimidiques est très voisin de 1.

III. DÉTERMINATION DE LA COMPOSITION EN BASES AZOTÉES DE L'A.R.N. ET DE L'A.D.N.

A. — SEPARATION QUANTITATIVE DES RIBONUCLEOTIDES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER.

Nous avons employé la méthode mise au point dans notre laboratoire et dont les avantages et les inconvénients ont été amplement discutés (54, 64, 123, 124).

B. — ELECTROPHORESE A HAUTE TENSION POUR LA SEPARATION DES RIBONUCLEOTIDES.

Après séparation des A.N. selon la technique de SCHMIDT et THANNHAUSER (90), les nucléotides de l'A.R.N. sont purifiés par passage sur colonne de charbon. Après évaporation, le résidu de l'éluat est repris par l'acide perchlorique N/10 et on neutralise avec de la potasse. Il se forme un précipité de perchlorate de potassium que l'on élimine par centrifugation. Le liquide surnageant, contenant les ribonucléotides, est lyophilisé, puis repris par 1 ml d'eau distillée (pour 400 µg de P ribonucléique). Cette solution est prête pour l'électrophorèse.

On utilise du papier MN Düren N° 214. Sur une feuille de 35×40 cm, la solution de nucléotides est placée à 10 cm du bord sur une largeur de 10 cm à l'aide d'une micropipette. Nous déposons sur la feuille 0,15 ml de solution. L'électrophorèse est effectuée dans un appareil à haute tension refroidi, sous tension de 2.750 volts. On

utilise un tampon d'acétate de lithium, mis au point dans notre laboratoire par Virmaux (communication personnelle). Ce tampon a la composition suivante: 2.000 ml d'acide acétique N/10 et 80 ml d'acétate de lithium, ce qui correspond à une concentration finale 0,1 M et un pH de 3,5.

Les mononucléotides migrent de la cathode vers l'anode. Au bout de 2 heures ils sont bien séparés et se trouvent dans l'ordre suivant: CMP, AMP, GMP et UMP. Les spots sont repérés grâce à leur fluorescence dans l'ultraviolet à l'aide d'une lampe «Mineralight» émettant un rayonnement qui se situe vers 2.500 Å. L'élution est faite avec 5 ml d'acide chlorhydrique 0,1 N dans le tube bouché et placé à l'étuve à 37° C pendant 15 heures.

Pour la détermination quantitative des différents nucléotides, on calcule la différence entre les D.O. lues à 2.600 et 2.800 Å. Ceci permet d'éliminer l'absorption propre du papier, non négligeable dans cette méthode. A l'aide de nucléotides purs SIGMA on a calculé qu'une différence de D.O. de 0,100 correspond pour l'acide cytidylique à 0,485 µg de P, pour l'acide adénylique à 0,270 µg, pour l'acide guanylique à 0,795 µg et pour l'acide uridylique à 0,455 µg.

D'autre part la quantité de phosphore des différents nucléotides est déterminée à l'aide de la technique de Chen et coll. (13).

C. — METHODE CHROMATOGRAPHIQUE POUR LA DETERMINATION QUANTITATIVE DE LA COMPOSITION EN BASES DE L'A.D.N.

Nous avons utilisé la méthode de chromatographie sur papier mise au point dans notre laboratoire par Rosenberg (87).

IV. TECHNIQUE DE MESURE DE QUELQUES ACTIVITÉS MÉTABOLIQUES

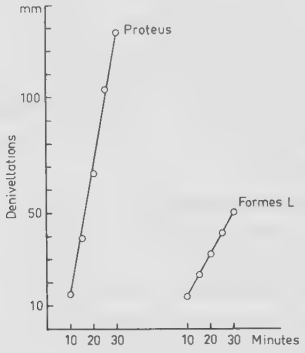
A. — DETERMINATION DE LA CONSOMMATION D'OXYGENE.

La consommation d'oxygène a été déterminé à l'appareil de Warburg en milieu de Ringer-Krebs glucosé et oxygéné (110).

Le culot microbien (environ 500 mg de poids frais) obtenu après centrifugation est mis en suspension dans 4 ml de liquide de Ringer-Krebs contenant 1 p. 100 de glucose.

Nous avons représenté graphiquement les résultats, en portant en abscisse le temps et en ordonnée les dénivellations. On obtient une droite (deux exemples sont donnés dans le graphique 1) qui permet

de calculer une valeur moyenne de la dénivellation en une heure. Cette valeur est multipliée par la constante du manomètre ce qui nous donne la quantité d'oxygène absorbée en une heure. Nous avons exprimé la consommation d'oxygène d'une part pour 1 mg de protéides, d'autre part pour 1 µg de P-A.D.N. en une heure.



Graphique 1

B. — DETERMINATION DE L'ACTIVITE ALDOLASIQUE.

Une molécule de fructose-1,6-diphosphate (F.D.P.) se scinde, sous l'action de l'aldolase, en deux molécules de trioses phosphates (une de glyceraldéhyde-3-phosphate et une de dihydroxyacétone phosphate).

Pour évaluer l'activité aldolasique, nous avons dosé colorimétriquement les trioses formés selon la technique de Sibley et Lehninger (93) en adoptant certaines modifications de la microméthode de Lowry et coll. (59).

Les microorganismes, après récolte par centrifugation, sont mis en suspension dans du tampon Tris (hydroxyméthyl) aminométhane 0,1 M, pH 8,6. La densité de la suspension est telle, qu'elle donne à 650 mµ au spectrophotomètre UNICAM SP 350, une absorption de 0,600-0,700 unités de D.O. (témoin = eau distillée).

Nous avons exprimé nos résultats en moles de F.D.P. scindées $\times 10^{-6}$ par 1 mg de protéides ou 1 µg de P-A.D.N. par heure. Pour cela, il fallait déterminer le coefficient d'extinction molaire des trioses dosés. D'après les indications de Lowry et coll. (59), nous avons trouvé la valeur de 11.740.

C. — DETERMINATION DES ACTIVITES DESHYDROGENASIQUES.

Nous avons étudié les activités déshydrogénasiques pour divers substrats par la méthode de Kun et Abood (49) au chlorure de 2, 3, 5 triphényl-tétrazolium (T.T.C.).

La réduction du T.T.C. est utilisée comme test de l'activité des déshydrogénases. Le T.T.C. est un produit incolore, soluble dans l'eau qui, sous l'action des réducteurs, se transforme en une substance fortement colorée en rouge orangé, le triphényl-formazan, insoluble dans l'eau, mais soluble dans l'acétone.

Comme substrats nous avons utilisé le succinate, le lactate, le pyruvate et le fumarate de sodium. En présence de succinate et de lactate se sont les activités déshydrogénasiques spécifiques (succinodéshydrogénase et lacticodéshydrogénase) que nous avons étudiées. En présence de pyruvate et de fumarate il s'agit de réactions complexes de déshydrogénation, dont le résultat final est l'oxydation des métabolites intermédiaires qui dérivent du substrat donné. Nous avons effectué parallèlement un témoin ne contenant pas de substrat et avons constaté que les déshydrogénations endogènes sont négligeables par rapport aux déshydrogénations s'effectuant à partir du substrat.

Les réactions enzymatiques sont réalisées dans des tubes de THUNBERG.

Les microorganismes sont mis en suspension dans un tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4. La densité de la suspension doit être la même que précédemment pour la mesure de l'activité aldolasique.

Les activités déshydrogénasiques sont exprimées en µg de T.T.C. réduit par heure et rapportées à 1 mg de protéides ou à 1 µg de P-A.D.N.

V. EMLPOI DE PHOSPHORE RADIO-ACTIF

Pour étudier le renouvellement des acides nucléiques et de leurs précurseurs dans les microorganismes en phase stationnaire, nous avons utilisé le ^{32}P.

Le $^{32}PO_4H_3$ sans entraîneur est fourni par le Commissariat à l'Energie Atomique. Nous mesurons, en coups/minute, l'activité de la solution de $^{32}PO_4H_3$ avant de l'introduire dans le milieu de culture.

Nous avons déterminé l'activité des nucléotides acido-solubles, de l'A.R.N. et de l'A.D.N. Les échantillons sont évaporés à sec sur plaquette d'argent en couche mince, sous une lampe à infra-rouge, et les mesures se font à l'aide d'un compteur cloche GEIGER-MULLER à fenêtre de mica de 1,8 mg par cm^2.

Les activités sont exprimées en coups/minute, ramenées au jour d'incubation en tenant compte de la décroissance du ^{32}P. Sur chaque échantillon, nous avons dosé la quantité de phosphore. Nous exprimons ensuite nos résultats en activité spécifique, c'est-à-dire en coups/minute pour 1 µg de P.

Incorporation de ^{32}P.

Les microorganismes sont cultivés en suspension dans le milieu hypertonique et incubés à 37° C pendant 15 heures pour le bacille et 48 heures pour les F.L ce qui correspond, compte tenu de la cinétique de leur croissance, à la phase stationnaire. Au bout de ces délais, les cultures sont centrifugées stérilement, puis réensemencées dans 60 ml de bouillon ordinaire dilué au dixième contenant 6,18 g de saccharose (concentration finale: 0,3 M), ce qui maintient l'hypertonicité nécessaire pour garder l'intégrité des F.L. Dans ce milieu on ajoute 20 μc de $^{32}PO_4H_3$.

La quantité de microorganismes réensemencée représente 150-200 mg de poids sec. Pour la fraction des F.L contenant les formes naines, le poids sec était de 50-60 mg. Nous avons effectué des essais avec des cultures totales de F.L en réensemençant des quantités de microorganismes correspondant à différents poids secs en présence d'une même dose de ^{32}P et nous n'avons constaté aucune différence dans le taux d'incorporation. Dans nos conditions expérimentales, la dose de phosphore radio-actif utilisée est par conséquent satisfaisante.

Les cultures mises en présence de ^{32}P sont incubées de 5 à 45 minutes à 37° C sous agitation continue. Nous avons vérifié par mesure de la turbidimétrie et par comptage des éléments microbiens, qu'au cours des 45 minutes d'incubation dans notre milieu dilué il n'y a pas de multiplication décelable des microorganismes. Des échantillons d'environ 15 ml sont prélevés au bout de 5, 15, 30 et 45 minutes et immédiatement insufflés dans 15 ml d'une solution froide de saccharose 0,3 M. Le choc froid doit stopper toute possibilité ultérieure d'incorporation de ^{32}P. Les microorganismes sont récoltés par centrifugation rapide à 0° C et lavés deux fois avec une solution glacée de NaCl à 9 p. 1000. Les culots sont ensuite soumis aux traitements chimiques et on procède aux déterminations de la radio-activité et du phosphore sur les diverses fractions.

Décroissance de la radio-activité des nucléotides acido-solubles, de l'A.R.N. et de l'A.D.N. ayant incorporé du ^{32}P.

Les deux types de microorganismes sont cultivés dans le milieu hypertonique. Dans 110 ml de milieu de culture, on introduit 2 μc de $^{32}PO_4H_3$. L'incubation est stoppée au bout de 6 heures pour le Proteus et 15 heures pour les F.L. Les microorganismes sont centrifugés stérilement, lavés une fois avec une solution de NaCl à 9 p. 1000 et réensemencés dans 60 ml du même milieu dilué décrit précédemment, auquel on ajoute encore 6 ml d'une solution de tampon phosphate pH 7,4. On réalise ainsi les conditions adéquates pour favoriser les échanges de phosphates entre les microorganismes et le milieu extérieur. La quantité de microorganismes ensemencée varie entre 50 et 200 mg de poids sec. Les cultures sont incubées à 37° C

sous agitation constante de 2 à 6 heures. Nous avons vérifié, par mesure de la turbidimétrie et par comptage des éléments microbiens, que dans ce milieu pauvre il n'y a pas multiplication des cellules durant les six heures, temps maximum d'incubation. Des prélèvements de 15 ml sont effectués au moment de la mise en incubation, puis au bout de 2, 4 et 6 heures de culture. Les échantillons sont immédiatement centrifugés, lavés deux fois avec une solution de NaCl à 9 p. 1000 et soumis aux différents traitements chimiques. Les solutions sont alors prêtes pour la détermination de la radio-activité et le dosage du phosphore.

VI. PRÉSENTATION DES RÉSUTLATS

Dans les tableaux et les graphiques, nous ne faisons figurer que la moyenne des valeurs expérimentales. Pour évaluer la dispersion, nous avons effectué le calcul de la déviation standard (s) selon la formule

$$s = \sqrt{\frac{\Sigma (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

x = valeur expérimentale

$\bar{x}$ = moyenne des valeurs expérimentales

n = nombre d'expériences

La valeur de la déviation standard précédée du signe $\pm$ accompagne la moyenne.

Comme notre étude porte sur une comparaison entre le bacille Proteus P18 et les divers types morphologiques des F.L nous avons appliqué le test t de Fischer aux résultats et nous avons choisi avec la majorité des chercheurs, un degré de certitude de 0,05.

Formule permettant le calcul de t:

les calculs à effectuer sont les suivants:

1) estimation de la variance commune:

$$s^2 = \frac{\Sigma (x - \bar{x})^2 + \Sigma (x' - x')^2}{n + n' - 2}$$

2) estimation de la variance de la différence $x - x'$ et de l'écart - type correspondant:

$$s(\bar{x} - \bar{x}') = \sqrt{\frac{n + n'}{nn'}} \cdot s$$

3) calcul de l'écart - réduit:

$$t = \sqrt{\frac{nn'}{n + n'}} \cdot \frac{\bar{x} - x'}{s}$$

x et x' sont les résultats de chaque expérience
$\bar{x}$ et $\bar{x}$' les moyennes
n et n' le nombre d'expériences
p = probabilité qu'ont deux moyennes d'être semblables.
Les moyennes présentent une différence significative si $p \leq 0{,}05$.

DEUXIEME PARTIE

RECHERCHES PERSONNELLES

I. ÉTUDES DES CULTURES DE FORMES L STABLES

A. — MISE AU POINT D'UNE METHODE DE CULTURE DES FORMES L.

Ainsi que nous l'avons déjà signalé dans l'introduction, nous avons été obligé de mettre au point une technique de culture des F.L afin d'obtenir des quantités suffisantes de ces microorganismes pour des études chimiques et métaboliques que nous voulions entreprendre.

Notre méthode est basée sur une constatation de LEDERBERG (52, 53). La pénicilline inhibant la synthèse de la paroi bactérienne, donne lieu à la formation de «protoplastes». Ces «protoplastes» comparables d'après LEDERBERG aux F.L géantes, subissent une lyse dans les milieux habituels de culture alors qu'ils se maintiennent en milieu hypertonique. Tenant compte des données de LEDERBERG, et du fait que les F.L stables sur lesquelles nous travaillons sont partiellement dépourvues de paroi, donc osmotiquement fragiles (46, 17, 106, 53, 103), nous avons réalisé des cultures de ces microorganismes en suspension dans un milieu liquide hypertonique. Pour cela des F.L stables, produites à partir du bacille Proteus P18 et cultivées en voiles selon la méthode de TULASNE sont ensemencées dans du bouillon DIFCO «Heart infusion broth», contenant 20 p. 100 de sérum de cheval, 2.000 U. de pénicilline par ml et du saccharose à une concentration finale de 0,3 M. Après ensemencement, la culture est soumise pendant 30 minutes à une agitation modérée afin de bien séparer les divers éléments constituant les voiles. La suspension est ensuite mise à l'étuve à 37° C. Au bout de 48 heures, nous obtenons une pousse abondante offrant environ 50 à 60 mg de substance sèche pour 120 ml de milieu, ce qui correspond à 30 tubes de culture en surface après 5 jours.

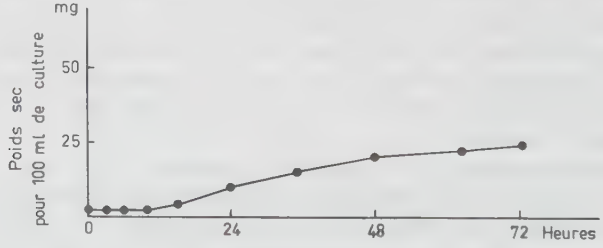
A partir de cultures en suspension, âgées de 48 heures, nous avons effectué des ensemencements répétés également en milieu hypertonique, contenant du sérum de cheval et de la pénicilline, à raison de 10 ml de suspension (ce qui représente environ 4 à 5 mg de substance sèche) pour 100 ml de bouillon, dans des fioles de ROUX placées

ensuite dans l'étuve à 37° C. Nous avons procédé à plus de 500 repiquages dans ce milieu hypertonique et avons toujours obtenu d'excellents rendements de culture. Par la suite, nous avons réduit la dose de sérum de cheval à 10 p. 100, la quantité de pénicilline à 1.000 U. par ml et la prolifération des microorganismes est restée inchangée. Les repiquages sont effectués chaque semaine et la culture est stockée à la température du laboratoire à l'obscurité.

Pour faire les études comparatives, nous avons cultivé le bacille Proteus P18 également dans le milieu hypertonique. Pour 100 ml de bouillon, nous mettons 10 ml de sérum de cheval et nous ensemençons avec 5 ml d'une suspension bactérienne âgée de 24 heures, ce qui correspond à environ 10 mg de substance sèche.

Il nous a également été possible de cultiver des F.L stables dans un milieu synthétique. Le milieu de Morgan et coll. (74) additionné de saccharose à la concentration finale de 0,3 M, nous a permis de réaliser des cultures en suspension en partant d'une culture en milieu hypertonique. Il était intéressant de noter le fait que l'on peut cultiver des F.L en suspension dans un milieu liquide synthétique, car d'après la littérature, la prolifération des F.L dans un tel milieu s'avère très difficile (1, 67). Notons cependant que sur milieu synthétique solide, des colonies de F.L ont été obtenues par Medill et O'Kane (67), Minck et coll. (71), Landman et coll. (51). Il convient cependant de remarquer que le rendement obtenu à partir de ces cultures en milieu synthétique était faible; c'est la raison pour laquelle nous n'avons pas utilisé ce milieu dans nos études biochimiques.

D'autre part nous avons essayé de cultiver les F.L dans le milieu liquide synthétique décrit par Abrams (1). Dans ce milieu la multiplication des F.L était cependant très lente et les cultures étaient essentiellement constituées par de petites formes granulaires. Aucune prolifération de ces F.L n'a pu être obtenue au delà du sixième repiquage. Le graphique 2 montre la croissance des cultures de F.L en milieu d'Abrams au troisième repiquage. L'examen de la courbe de croissance met en évidence que les quantités de microorganismes récoltées en phase stationnaire sont bien plus faibles que celles obtenues par notre méthode de culture en bouillon hypertonique (voir graphique 3).



Graphique 2

Croissance des cultures de formes L en milieu d'Abrams.

Nous avons réalisé des ensemencements sur gélose molle et en surface sur bouillon nutritif à partir des cultures de F.L provenant de notre milieu hypertonique. Ces réensemencements ont donné respectivement dans les deux milieux des colonies L et des voiles avec la morphologie habituelle. L'aspect microscopique des F.L constituant ces colonies L et ces voiles est illustré dans les figures 1 et 2. Les voiles ont d'ailleurs pu être repiqués avec succès en bouillon hypertonique. Il apparaît ainsi que les F.L cultivées en suspension maintiennent intactes leurs propriétés de prolifération dans les conditions de culture utilisées antérieurement.

B. — ETUDE MORPHOLOGIQUE DE DIVERSES CULTURES DE FORMES L.

Les études morphologiques des F.L (voir revues générales citées dans l'introduction) ont montré qu'une colonie L est constituée par des organismes globuleux de diverses tailles, les plus petits ayant un diamètre de 0,1 μ, les plus grands atteignant 15 à 25 μ de diamètre. Il était donc nécessaire d'étudier la morphologie des F.L cultivées dans notre milieu hypertonique avant d'entreprendre sur ces microorganismes des études biochimiques.

Nous avons observé les divers éléments constituant une culture de F.L. en milieu liquide hypertonique au microscope à contraste de phase. Ces cultures contiennent des grandes formes globuleuses de 8,1 à 11,4 μ de diamètre, des organismes ronds de taille moyenne (2,2 à 8,0 μ), des éléments petits de 1,0 à 2,1 μ et enfin des formes naines punctiformes à la limite de la visibilité, d'autres invisibles au microscope à contraste de phase (0,1 à 0,9 μ). Ces dernières ont pu être mises en évidence grâce à la microscopie électronique.

La figure 3 montre l'aspect au microscope à contraste de phase d'une culture de F.L en milieu hypertonique. La photo de la figure 4, prise au microscope électronique, met en évidence les formes naines.

Il nous a paru intéressant d'étudier quantitativement la répartition des F.L de diverses tailles dans nos cultures en suspension et dans celles obtenues en surface et sur gélose. Les déterminations sont effectuées sur des F.L âgées respectivement de 48 heures, de 5 jours et de 3 jours pour les trois types de culture, ce qui correspond au stade de début de leur phase stationnaire. Le comptage des divers éléments des F.L est pratiqué au microscope à contraste de phase dans la cellule de Thoma. Le diamètre de ces diverses formes est mesuré avec un objectif à immersion Ph 3 100 × et avec un oculaire HM 9× ZEISS. Pour les cultures sur gélose, les éléments d'une colonie sont mis en suspension dans quelques gouttes d'une solution de NaCl à 9 p. 1000. Nous avons effectué une vingtaine de déterminations pour chaque type de culture.

Figure 1
Formes L provenant d'une colonie L.

Figure 2
Formes L provenant des «voiles».

Figure 3
Culture de formes L en milieu hypertonique. Contraste de phase (× 800).

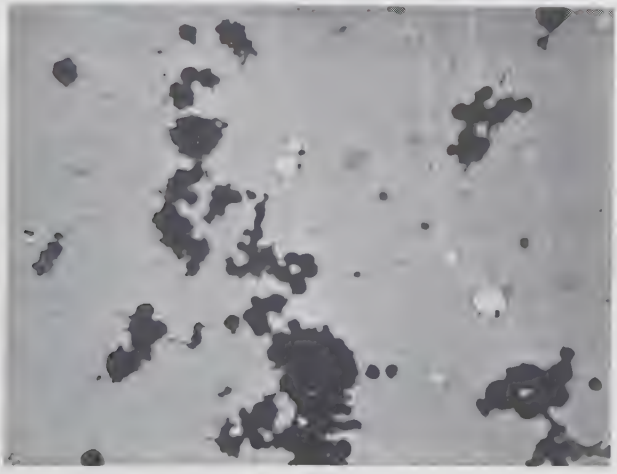


Figure 4
Culture de formes L en milieu hypertonique. Microscopie électronique (× 2.300).
Mettant en évidence les petites formes invisibles au microscope à contraste de phase.

Les résultats obtenus sont consignés dans le Tableau 1.

Il ressort de l'examen du tableau que la culture en suspension ne contient pas de formes géantes de 11,5 à 24 μ de diamètre, présentes dans les cultures en surface et sur gélose. Pour ce qui est des autres formes (1,0 à 11,4 μ), leur taux est très voisin pour les cultures en suspension et celles en surface. Les colonies L obtenues sur gélose

Tableau 1

Répartition des formes L de diverses tailles selon le milieu de culture.

Types de culture \ Diamètre en μ	1,0 - 2,1	2,2 - 4,4	4,5 - 8,0	8,1 - 11,4	11,5 - 24
Culture en suspension	51 ± 3,5	29 ± 5,3	14 ± 3,5	6 ± 1,2	0
Culture en surface	47 ± 3,9	32 ± 2,0	12 ± 3,2	5 ± 0,5	4 ± 1,1
Culture sur gélose	38 ± 8,4	25 ± 4,5	22 ± 4,5	10 ± 3,5	5 ± 2,5

Valeurs exprimées en pour cent de la quantité totale des formes visibles au microscope à contraste de phase.

Tableau 2

Répartition des formes L de diverses tailles de cultures en suspension à différents stades de la croissance.

Age de la culture (heures) \ Diamètre en μ	1,0 - 2,1	2,2 - 4,4	4,5 - 8,0	8,1 - 11,4
6	28 ± 2,9	24 ± 2,8	28 ± 2,2	20 ± 1,6
9	40 *) ± 3,0	26 ± 1,9	23 ± 1,8	11 *) ± 0,9
24	50 *) ± 3,2	30 ± 4,2	13 *) ± 2,9	7 *) ± 1,0
48	51 *) ± 3,5	29 ± 5,3	14 *) ± 3,5	6 *) ± 1,2

Valeurs exprimées en pour cent de la quantité totale des formes visibles au microscope à contraste de phase.

*) Différences significatives par rapport à la valeur du délai de 6 heures ($p < 0,05$).

contiennent en moyenne un nombre plus élevé d'éléments grands (4,5-24 μ), tandis que le pourcentage des formes petites (1,0 à 4,4 μ) est relativement plus faible que dans les deux autres types de culture. Ceci pourrait s'expliquer partiellement, pour les cultures sur milieu solide, par le fait que le centre de la colonie L composé surtout de formes petites, est incrusté dans la gélose, donc difficilement détachable.

Nous avons également déterminé quantitativement la répartition des F.L de diverses tailles dans les cultures en suspension à différents stades au cours de la croissance de ces microorganismes. Notre choix s'est fixé sur les périodes de 6, 9 et 24 heures. Celles de 6 et 24 heures représentent respectivement le début et le délai proche de la fin de la phase de prolifération active. Pour chaque temps, nous avons effectué dix déterminations.

Le tableau 2 résume les résultats obtenus.

L'examen du tableau montre que pendant la phase de croissance active, la culture de F.L s'appauvrit en éléments globuleux grands et s'enrichit en formes petites. Après 24 heures, la proportion relative en ces différents éléments ne varie plus.

C. — CINETIQUE DE LA CROISSANCE DU BACILLE PROTEUS P18 ET DES FORMES L.

Nous avons déterminé la cinétique de la croissance de la bactérie normale cultivée dans le bouillon hypertonique et des F.L cultivées d'une part en surface selon Tulasne, d'autre part en suspension dans notre milieu hypertonique. Les microorganismes sont incubés à 37° C.

L'évolution des cultures en fonction du temps est suivie par détermination de la turbidité et du poids sec *). La turbidité est mesurée à 650 mμ au spectrophotomètre UNICAM SP 350 dans des tubes de 19 mm de diamètre (témoin = bouillon). Le poids sec est déterminé d'une part après séchage d'un échantillon à l'étuve à 105° C jusqu'à poids constant, d'autre part, après lyophilisation du culot microbien entier. Le maintien de l'intégrité des F.L nécessite le lavage du culot microbien par une solution de NaCl à 9 p. 1000. Aussi la quantité de NaCl pouvant rester dans le culot après récolte et lavage des microorganismes était susceptible de fausser les valeurs du poids sec. Pour éviter cette erreur, nous avons dosé le sodium par photométrie de flamme d'une part sur notre prise d'essai, d'autre part, sur un échantillon témoin lavé avec une solution de saccharose à 5 p. 100 protégeant également l'intégrité des F.L; ceci nous permettait d'évaluer la quantité de sodium propre aux microorganismes

*) Nous n'avons pas effectué de numération des germes microbiens, car dans une population de F L les formes naines sont invisibles au microscope à contraste de phase.

et celle de chlorure de sodium contaminante qui ne dépassait pas 1 p. 100. Quelques valeurs expérimentales sont exposées dans le tableau 3.

Le tableau 4 indique les résultats obtenus par les deux types de déterminations, poids sec à 105° C et poids sec après lyophilisation, toujours menées parallèlement.

Tableau 3

Poids sec microbien (mg)	40,3	18,9	19,2	31,6	17,0	21,7
Quantité de ClNa contaminante (mg)	0,30	0,13	0,15	0,23	0,14	0,19

Tableau 4

Détermination du poids sec.

Expériences	Poids sec à 105° C	Poids sec après lyophilisation
1	26,8	27,0
2	14,0	14,5
3	27,8	30,0
4	25,5	25,1
5	18,9	19,2

Les résultats sont exprimés en mg et rapportés à un même volume de culture.

Les deux méthodes donnent des résultats similaires aux erreurs d'expériences près. Nous avons préféré la lyophilisation qui est une méthode moins brutale.

La cinétique de la croissance du Proteus et des F.L est illustrée par le tableau 5 et les graphiques 3 et 4. Aux diverses périodes examinées, nous avons procédé à une trentaine de mesures de la turbidité et du poids sec.

En comparant les courbes de croissance des deux types de culture des F.L, nous constatons que la culture en suspension a une croissance rapide entre 2 et 48 heures, tandis que la culture en voile ne présente de pousse réelle qu'après 48 heures. Les F.L. cultivées en surface atteignent la phase stationnaire au bout de 5 jours, alors que la culture en suspension s'y trouve déjà après 48 heures. Les F.L. en suspension dans le milieu hypertonique ont donc une vitesse de croissance bien plus rapide que les F.L. cultivées en voiles.

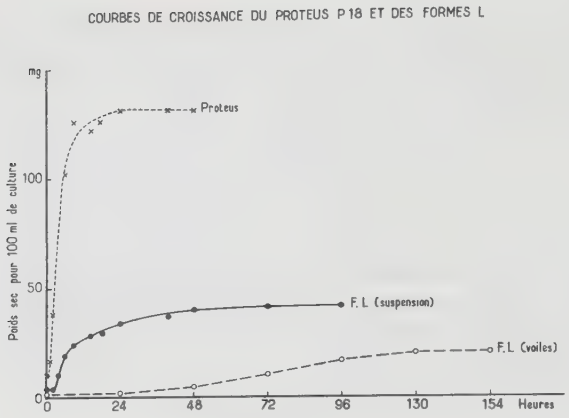
En comparant les courbes de croissance du Proteus et des F.L. en suspension, nous avons noté que la courbe de turbidimétrie con-

corde avec celle des poids secs uniquement pour les phases de latence et logarithmique. Au cours de la phase stationnaire, des précipités de phosphates et d'autres sels qui se forment dans le milieu de culture, interfèrent certainement dans les lectures de turbidité. Nous avons, par conséquent, préféré examiner les courbes de croissances obtenues par la détermination des poids secs, mesure qui nous paraît plus exacte. Nous constatons pour la bactérie un accroissement intense entre 1 et 7 heures, la phase logarithmique étant pratiquement terminée après 9 heures et le plateau de la phase stationnaire commençant au bout de 24 heures. Pour les F.L, la phase active de développement se situe entre 2 et 9 heures, puis la croissance se ralentit tout en restant effective jusqu'à 48 heures. Ensuite commence la phase stationnaire.

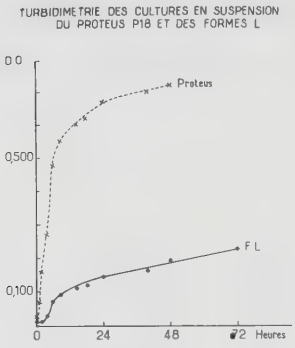
Tableau 5

Croissance des cultures de Proteus P18 et de formes L en bouillon hypertonique. Poids sec en mg pour 100 ml de culture.

Age de la culture (heures)	Organismes	
	Proteus P18	Formes L
0	9,8 ± 1,3	4,6 ± 0,2
1	10,6 ± 0,9	—
2	38,0 ± 2,3	5,1 ± 0,3
4	—	9,5 ± 0,7
6	102 ± 9,7	19,3 ± 1,4
9	126 ± 13,6	24,5 ± 2,1
15	122 ± 12	28,0 ± 1,9
18	126 ± 14,9	29,5 ± 1,7
24	131 ± 10,8	34,0 ± 2,4
39	131 ± 11	34,3 ± 2,9
48	131 ± 13,2	40,4 ± 2,8



Graphique 3



Graphique 4

D. — FRACTIONNEMENT D'UNE CULTURE DE FORMES L EN SES DIVERSES ESPECES MORPHOLOGIQUES.

1° Méthode.

Nous avons séparé les diverses espèces morphologiques des F.L à l'aide de centrifugations différentielles dans une solution de saccharose 0,3 M suivies de lavages par une solution de NaCl à 9 p. 1000. Ces solutions respectent l'intégrité des F.L. osmotiquement fragiles.

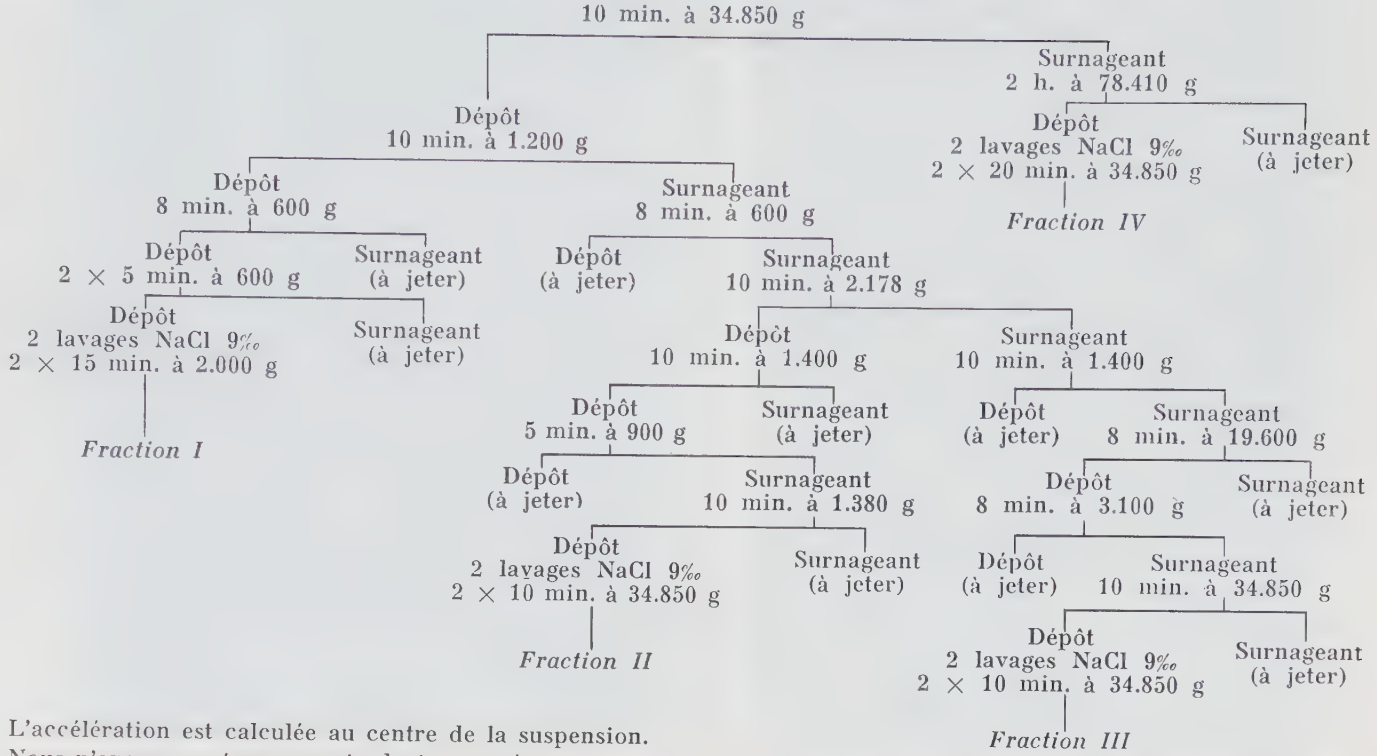
Les centrifugations à faibles vitesses sont effectuées dans la centrifugeuse réfrigérée MSE, les centrifugations rapides à l'ultracentrifugeuse réfrigérée SPINCO L. Toutes les manipulations se font à 0-2° C.

Le mode opératoire est schématisé dans le tableau 6.

A partir des cultures de F.L en suspension dans le milieu hypertonique, nous avons isolé quatre fractions. La fraction I contient

Tableau 6

Méthodes de fractionnement des formes L en milieu hypertonique.
Cultures formes L de 48 h. d'incubation.



L'accélération est calculée au centre de la suspension.
Nous n'avons pas tenu compte du temps nécessaire au rotor pour atteindre son régime et pour revenir au repos.

les éléments de grande taille et la fraction II ceux de taille moyenne; la fraction III renferme les petites formes et la fraction IV correspond aux formes naines. Les organismes globuleux de grande taille sédimentent après 10 minutes de centrifugation à 1.200 g, les formes de taille moyenne se déposent après 10 minutes à 2.178 g, les éléments petits se retrouvent dans le culot après 10 minutes de centrifugation à 34.850 g et les formes naines après 2 heures à 78.410 g. Quand cela pouvait présenter un intérêt pour la précision des déterminations, en particulier pour s'assurer si certaines différences sont significatives, nous avons procédé à une purification plus poussée de la fraction IV en faisant suivre à la centrifugation à 78.410 g une remise en suspension dans la solution de saccharose 0,3 M et une centrifugation à 600 g suivie d'une recentrifugation du surnageant à 78.410 g.

Comme le montre le schéma, nous avons procédé à de nombreuses centrifugations, ceci dans le but d'obtenir les fractions aussi pures que possible. L'adoption de ce procédé entraîne une élimination par les liquides de lavages de 40 à 50 pour cent de la culture. Les figures 5 à 13 démontrent la purification progressive des fractions I, II et III.

Figure 5
Cultures de F.L centrifugées 10 min. à 34.850 g.
Contraste de phase (× 800).

Purification de la fraction I:

Figure 6
Centrifugation de 10 min. à 1.200 g — Contraste de phase (× 800).

Figure 7
Centrifugation de 8 min. à 600 g — Contraste de phase (× 800).

Figure 8
Centrifugation de 5 min. à 600 g — Contraste de phase (× 800).

Purification de la fraction II:

Figure 9
Centrifugation de 10 min. à 2.178 g — Contraste de phase (× 800).

Figure 10
Centrifugation de 10 min. à 1.400 g — Contraste de phase (× 800).

Figure 11
Centrifugation de 10 min. à 1.380 g — Contraste de phase (× 800).

Purification de la fraction III:

Figure 12
Centrifugation de 8 min. à 19.600 g — Contraste de phase (× 800).

Figure 13
Centrifugation de 16 min. à 34.850 g — Contraste de phase (× 800).

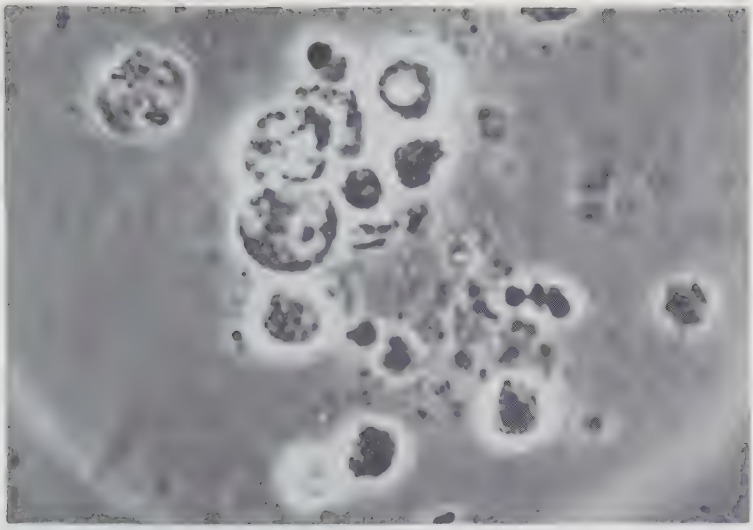


Figure 14
Fraction I — Contraste de phase (× 800).

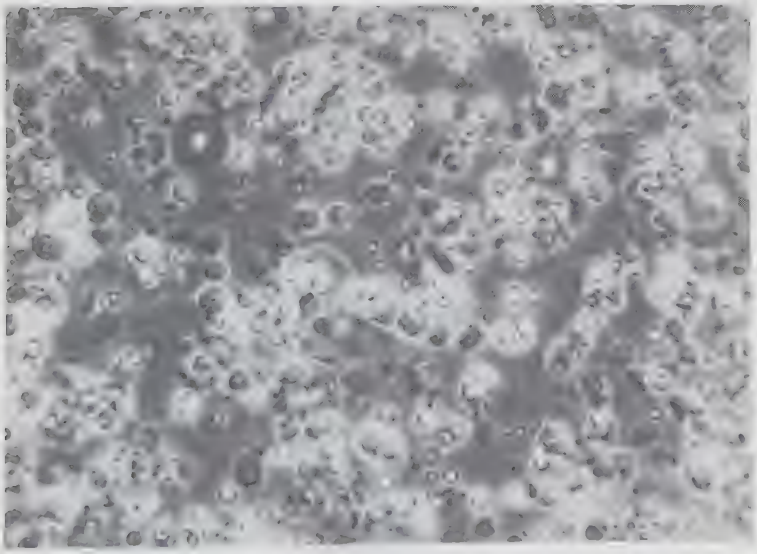


Figure 15
Fraction II — Contraste de phase (× 800).

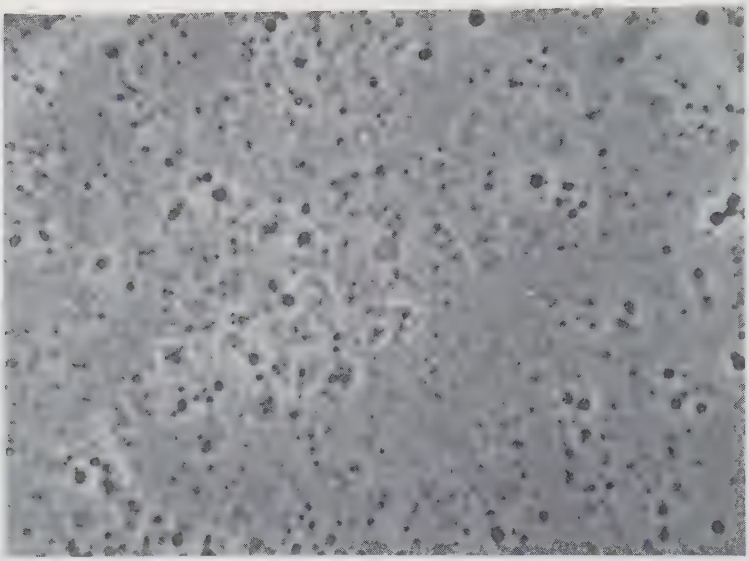


Figure 16
Fraction III — Contraste de phase (× 800).

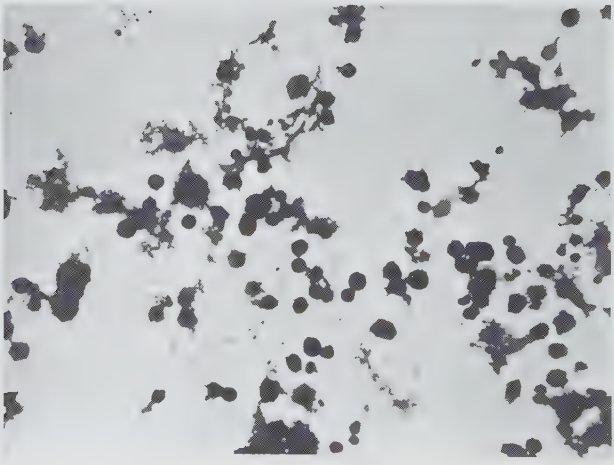


Figure 17
Fraction IV — Microscopie électronique (× 4.800).

Les figures 14-17 montrent l'aspect microscopique des diverses fractions. Les fractions I, II et III ont été photographiées au microscope à contraste de phase. La photo de la fraction IV (formes naines) a été prise au microscope électronique.

Nous avons déterminé le poids sec des diverses fractions par rapport au poids sec de la culture totale et évaluant également celui des microorganismes qui se trouvent dans les liquides de lavages. Le tableau 7 illustre les résultats de 11 expériences. Si l'on ne considère que les fractions pures, en moyenne 16,5 pour cent du poids sec total reviennent à la fraction I, 20,5 pour cent à la fraction II, 13,2 pour cent à la fraction III et 4,4 pour cent à la fraction IV. Les liquides de lavage, que nécessitent les purifications des fractions, qui renferment 45,4 pour cent du poids sec total, sont constitués essentiellement par des éléments de la fraction I et II, ainsi qu'il en ressort de l'examen du résidu au microscope à contraste de phase. Ceci s'explique aisément par le fait que pour obtenir les fractions aussi pures que possibles nous avons effectué, au cours de la purification des fractions II et III, des centrifugations à vitesse faible et les culots obtenus, renfermant essentiellement des éléments grands, étaient joints aux liquides de lavages. Nous voyons donc en première approximation que 1/5 de la culture est constituée par les fractions III et IV, par contre 4/5 par les fractions I et II.

Tableau 7

Poids sec des diverses fractions des formes L en pour cent du poids sec de la culture totale.

Fr. I	Fr. II	Fr. III	Fr. IV	Liquides de lavages
16,5 ± 4,3	20,5 ± 3,6	13,2 ± 1,9	4,4 ± 0,5	45,4 ± 10,7

2° Répartition des F.L. de diverses tailles dans les fractions.

Nous avons contrôlé la validité de la méthode de fractionnement des cultures de F.L en déterminant le pourcentage des éléments de différentes tailles dans chaque fraction. Nos essais ont porté sur des cultures en phase stationnaire et nous en avons examiné une vingtaine. La répartition des F.L de diverses tailles dans les fractions I, II et III est consignée dans le tableau 8. Ayant opéré seulement dans le visible, il ne nous a pas été possible d'examiner effectivement la fraction IV qui renferme les formes naines. Nous nous sommes assurés cependant que cette dernière fraction ne contenait pas d'éléments des fractions I et II et seulement de très rares éléments, parmi les plus petits, de la fraction III. Le comptage des éléments et la mesure de leur diamètre ont été effectués comme précédemment.

Tableau 8

Répartition des formes L de diverses tailles dans les fractions isolées par centrifugation différentielle d'une culture de formes L en suspension dans le milieu hypertonique.

Fractions \ Diamètre en μ	1,0—2,1	2,2—4,4	4,5—8,0	8,1—11,4
Fr. I	0	0	88,1 ± 7,02	11,9 ± 5,2
Fr. II	0	94,9 ± 3,11	5,1 ± 0,45	0
Fr. III	97,4 ± 2,1	2,6 ± 2,0	0	0

Valeurs exprimées en pour cent du nombre total des F.L de chaque fraction.

Il ressort de l'examen du tableau que les éléments de 4,5 à 11,4 μ de diamètre constituent la fraction I. Les formes de 2,2 à 4,4 μ et quelques rares organismes de 4,5 à 8,0 μ se retrouvent dans la fraction II. La fraction III contient les petits granules de 1,0 à 2,1 μ de diamètre et un nombre infime de formes plus grandes (2,2 à 4,4 μ). On constate que la contamination d'une fraction par une autre est relativement faible.

Par la microscopie électronique, nous avons pu vérifier que la fraction III n'est que très peu contaminée par des éléments ayant un diamètre inférieur à 1 μ (figure 18).

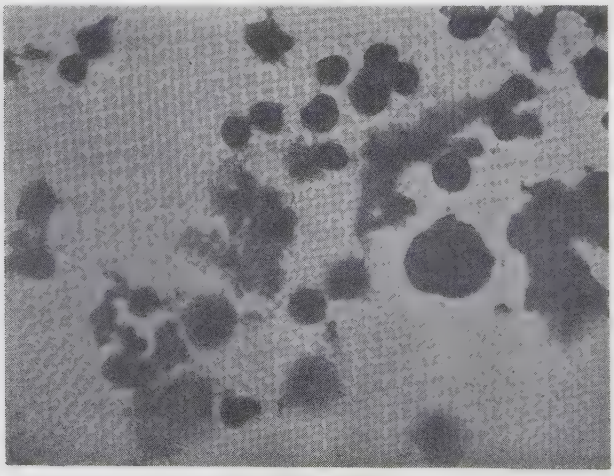


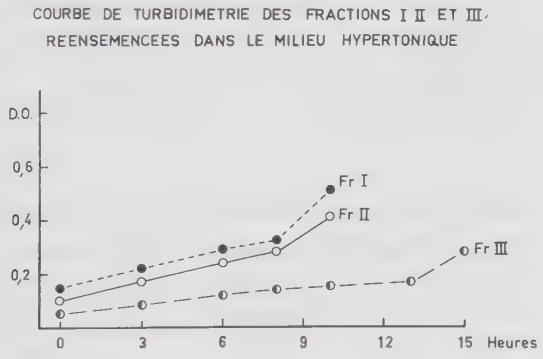
Figure 18
Fraction III — Microscopie électronique × 4.000).

3° Etude comparée du pouvoir de prolifération des diverses fractions.

Ayant été la première à séparer les diverses espèces morphologiques des F.L, il nous a paru intéressant d'examiner leur pouvoir de prolifération sur une grande échelle. Les observations n'ont porté, jusqu'à présent, que sur des éléments isolés par filtration ou par micromanipulation. Les trois premières fractions donnent aisément lieu à une culture de F.L aussi bien en milieu liquide que sur milieu solide. En ce qui concerne la fraction IV, la production des F.L. n'est pas constante; le départ de la pousse quand elle existe est très lente et le rendement est faible. Aussi, y a-t-il lieu de se demander, si, dans ce dernier cas, l'obtention d'une culture de F.L n'est pas due aux contaminations provenant des formes plus grandes. Après filtration de la fraction IV à travers une bougie CHAMBERLAND 3L3, aucune prolifération n'a pu être mise en évidence dans nos conditions expérimentales.

Après ensemencement des F.L des fractions I, II et III dans du bouillon hypertonique additionné de sérum de cheval (10 p. 100) et de pénicilline (1000 U. par ml), nous avons suivi la prolifération des divers éléments par mesure de la turbidité.

Les résultats sont donnés dans le graphique 5 et représentent une moyenne de dix expériences.



Graphique 5

Tableau 9

Nombre de colonies produites par 1000 éléments de chaque fraction d'une culture de formes L de 48 heures.

Fraction I	Fraction II	Fraction III
19 ± 1,0	12 ± 1,1	0,32 ± 0,01

Le comptage des colonies L est effectué après 5 jours d'incubation.

Les cultures provenant de la prolifération des corps globuleux grands contiennent après les premières heures d'incubation surtout des formes de taille moyenne (2 à 8 μ), alors que la culture issue des formes de la fraction II présente à cette même période de très nombreux corps petits (1 à 2 μ). Au bout de 10 heures, les organismes des fractions I et II ont reconstitué tous les éléments du cycle L.

Les formes petites (fraction III) donnent d'abord naissance aux corps globuleux de taille moyenne et seulement après 15 heures toutes les espèces morphologiques des F.L sont reconstituées.

Nous avons comparé l'aptitude des divers types morphologiques des F.L issus de notre milieu liquide à donner directement de nouvelles colonies sur milieu solide (bouillon gélosé). Chaque fraction est mise en suspension dans une solution de saccharose 0,3 M, on détermine le nombre des éléments et on ensemence un volume connu selon la méthode de Gratia. Nous avons effectué vingt expériences.

Le tableau 9 donne les résultats obtenus.

Il ressort de l'examen du tableau que les corps globuleux de la fraction I présentent dans nos conditions expérimentales la plus grande vitalité ou faculté d'adaptation au nouveau milieu. Le nombre de colonies fournies est inférieur pour la fraction II, mais il reste relativement proche de la fraction I. Par contre, les éléments isolés de la fraction III donnent un nombre de colonies infiniment plus faible que les organismes des fractions I et II.

Nous avons également ensemencé ces diverses fractions sur un milieu synthétique solide (milieu B de Minck et coll. [71]). Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 10.

Tableau 10

Nombre de colonies produites par 1000 éléments de chaque fraction d'une culture de formes L de 48 heures.

Fraction I	Fraction II	Fraction III
68 ± 7,2	56 ± 5,3	4,0 ± 1,9

La multiplication des diverses F.L après ensemencement sur milieu synthétique solide (milieu B de Minck et coll. [71]). Les résul-

On pourrait se demander si ce n'est pas la contamination de la fraction III par des éléments plus grands appartenant à la fraction II qui est à l'origine de la production des colonies. Pour résoudre ce problème nous avons ensemencé par micromanipulation en milieu gélosé à 0,2 p. 100 (milieu semi-solide) les organismes globuleux de 1 à 2 μ de diamètre qui constituent la 3e fraction. Presque toutes les formes ensemencées (environ 600) ont donné naissance à une

colonie L. Notons que les grandes formes globuleuses des fractions I et II avaient déjà été étudiées à cet égard par Roux (88), qui obtient dans les mêmes conditions de transfert sur milieu gélosé à 0,2 p. 100 seulement une forme sur deux viable.

Rappelons que pour la fraction IV il est difficile d'indiquer un facteur de vitalité. Mais si on considère uniquement les formes visibles, la fraction IV ne renferme qu'extrêmement peu d'éléments reproductibles, susceptibles de s'expliquer par une contamination par des formes plus grandes.

II. CONSTITUTION CHIMIQUE GLOBALE DU BACILLE PROTEUS P 18 ET DES FORMES L STABLES.

A. — DETERMINATION QUANTITATIVE DE LA TENEUR EN LIPIDES, EN PROTEIDES ET EN ACIDES NUCLEIQUES DU PROTEUS P18 ET DES FORMES L EN PHASE STATIONNAIRE.

La nécessité de la confrontation entre les divers éléments des F.L dans une même culture est évidente. De même, quand il s'agit de comparer les F.L aux bactéries, il convient de rechercher les stades correspondant dans le rythme de la prolifération de ces deux types de microorganismes. On sait, en effet, que la constitution chimique des bactéries varie selon le stade de développement dans lequel elles se trouvent. Il en est très vraisemblablement de même pour les cultures de F.L.

Nous avons déterminé la teneur en lipides, en protéides et en A.N. du Proteus, des F.L totales et des divers types morphologiques de ces dernières. Dans une première étude, nous avons choisi pour nos essais comparés la période de phase stationnaire qui suit la croissance rapide. Les microorganismes cultivés en suspension dans le milieu hypertonique sont incubés à 37° C pendant 24 heures pour

Tableau 11

Teneur en lipides du Proteus P18 et des diverses fractions des formes L.

Organismes		Nbre Exp.	mg lipides pour 100 mg poids sec
Proteus P18		10	6,87 ± 1,71
Formes L	Culture Entière	8	17,60 ± 0,77
	Fr. I	5	8,89 ± 0,74
	Fr. II	5	14,70 ± 1,40
	Fr. III	5	33,70 ± 2,10
	Fr. IV	5	4,10 ± 0,97

le Proteus et 48 heures pour les F.L. Comme l'a montré l'étude de la cinétique de la croissance, nos microorganismes se trouvent être à ces délais dans leur phase stationnaire. Les bactéries et les F.L sont récoltées comme indiqué au chapitre des méthodes et les diverses fractions des F.L sont obtenues par la technique de fractionnement que nous venons de décrire.

1° **Détermination quantitative de la teneur en lipides.**

Le tableau 11 indique la teneur en lipides du Proteus et des diverses fractions des F.L.

En examinant les résultats obtenus, nous voyons que, par unité de poids sec, la quantité de lipides est dans les F.L 2,56 fois plus élevée que dans le bacille ($p < 0,01$). La confrontation du taux des lipides des diverses fractions des F.L au sein d'une même culture montre des valeurs nettement différentes qui sont respectivement pour les fractions I, II, III et IV en moyenne de 8,89; 14,70; 33,70 et 4,10 mg de lipides pour 100 mg de poids sec [1]).

Les résultats de la détermination du phosphore lipidique dans la bactérie et les F.L totales sont présentés dans le tableau 12.

Tableau 12

Teneur en phosphore lipidique du Proteus P18 et des formes L.

Organismes	Nbre . Exp.	μg P lipidique pour 1 mg lipides
Proteus P18	10	32 ± 3,4
Formes L	8	33 ± 2,9

Il n'y a pas de différence entre les deux types de microorganismes si l'on considère le taux du P lipidique au sein des lipides. Il n'en est pas de même si l'on envisage la teneur en P lipidique par rapport au poids sec vu les résultats du tableau 11. Nous y reviendrons lors de la discussion.

2° **Détermination quantitative de la teneur en protéides.**

Le taux des protéides dans nos microorganismes est déterminé par pesée du résidu d'extraction acide et lipidique ou par dosage de l'azote protéidique. Nous avons voulu vérifier que le poids du résidu sec délipidé correspondait bien à celui des protéides. L'azote protéidique est dosé après kjeldhalisation par le réactif de Nessler. Pour cela, le résidu délipidé est hydrolysé par de la soude ou de la potasse 0,5 N pendant 15 heures à 37° C. L'azote est déterminé sur une partie aliquote d'hydrolysat. Le taux de protéides est évalué en multipliant les valeurs d'azote obtenues par le facteur de 6,25. Nous

*) Le calcul statistique montre que les différences sont significatives ($p. < 0,01$).

avons adopté l'hydrolyse alcaline préliminaire, car elle permet des dosages parallèles des A.N. Le tableau 13 indique la correspondance entre les valeurs trouvées par pesée et par dosage de l'azote protéidique. Les résultats sont exprimés en mg pour 100 ml de suspension microbienne (correspond à environ 100 mg de substance sèche pour le bacille et à 40 mg pour les F.L).

Tableau 13

Détermination des protéides.

Méthodes / Organismes	Pesée	Dosage
Proteus	68,0	63,0
	73,0	77,0
	84,0	79,0
	68,0	69,3
	60,0	62,0
	75,6	78,8
	67,4	65,9
Formes L	19,9	17,2
	14,8	13,6
	15,2	15,1
	18,0	17,1
	22,4	21,4
	16,6	15,8
	15,2	15,0

On peut constater qu'aux erreurs d'expériences près, les valeurs sont similaires par les deux méthodes.

Nous pouvons donc considérer le poids sec du résidu obtenu après élimination des composés acido-solubles et des lipides comme étant l'expression de celui des protéides, et ceci d'autant plus que l'application du facteur conventionnel 6,25 fournit des valeurs moins certaines que la pesée qui suit l'élimination des constituants non protéidiques.

Le taux des protéides dans le Proteus, les F.L totales et les diverses espèces morphologiques de ces dernières est consigné dans le tableau 14.

Nous ne trouvons pas de différence significative pour la quantité de protéides entre le bacille et la totalité des F.L (p: 0,30-0,20). En ce qui concerne les diverses fractions des F.L, les fractions I et II contiennent une teneur en protéides similaire à celle du bacille. La fraction III renferme en moyenne 53,3 mg de protéides pour 100 mg de poids sec et la fraction IV 59,7 contre 68,4 et 68,5 pour les fractions I et II. La différence est significative comme le montre le calcul statistique ($p < 0,02$).

Tableau 14

Teneur en protéides du Proteus P18 et des diverses fractions des formes L.

Organismes		Nbre Exp.	mg protéides pour 100 mg poids sec
Proteus P18		20	66,8 ± 4,5
Formes L	Culture Entière	20	64,9 ± 3,9
	Fr. I	15	68,4 ± 6,1
	Fr. II	15	68,5 ± 5,8
	Fr. III	10	53,3 ± 2,1
	Fr. IV	8	59,7 ± 3,4

3° **Détermination quantitative de la teneur en acides nucléiques.**

Les quelques travaux concernant l'étude comparée des A.N. dans les bactéries et les F.L qui en dérivent n'ont porté que sur des cultures globales de F.L. Il nous a paru intéressant d'étudier également la teneur en A.R.N. et en A.D.N. des divers types morphologiques de ces derniers microorganismes. En plus du fractionnement habituel, nous avons procédé à une séparation au sein de la fraction IV (formes naines) des éléments passant à travers un filtre CHAMBERLAND 3L3, par conséquent invisibles au microscope à contraste de phase. La figure 19 montre les éléments de la fraction IV filtrée dont le diamètre est inférieur à 0,3 μ.

Dans certains cas, l'A.R.N. a été déterminé à la fois par dosage du ribose à l'aide de l'orcine et de la phloroglucine et par analyse des ribonucléotides ribonucléique fixés sur charbon actif.

Le tableau 15 montre les valeurs obtenues par les trois techniques.

Il en résulte que ces méthodes donnent des résultats similaires aux erreurs d'expériences près. Aussi avons-nous adopté la technique à l'orcine pour la détermination du ribose de l'A.R.N. dans nos microorganismes en exprimant toujours les valeurs en P-A.R.N. d'après les courbes d'étalonnage.

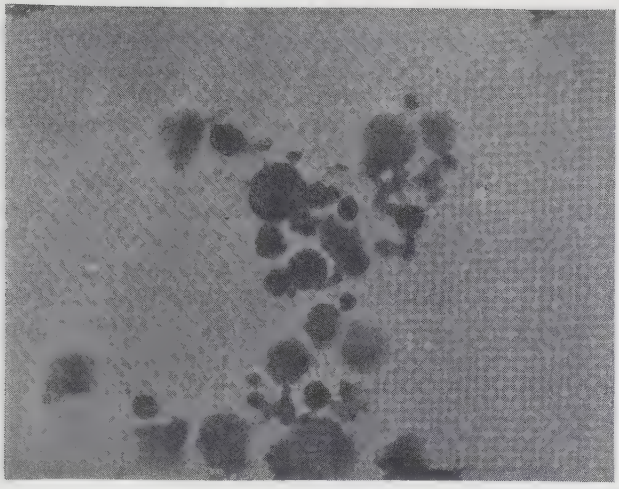


Figure 19
Fraction IV filtrée. Microscopie électronique (× 20.000).

On a calculé le P-A.D.N. à partir des valeurs données par le dosage du désoxyribose à la diphénylamine.

L'étude comparée de la teneur en A.R.N. et en A.D.N. des bactéries, de l'ensemble des F.L et des divers types morphologiques est représentée dans le tableau 16.

De l'examen du tableau il ressort que le taux de l'A.R.N. dans les F.L. totales et les bactéries examinées durant la phase stationnaire est de 1.190 ± 76 µg de P-A.R.N./100 mg de protéides pour le bacille et de 1.459 ± 41 pour les F.L, soit supérieur dans ces dernières ($p < 0,02$). En ce qui concerne l'A.D.N., on trouve respectivement pour ces deux types de microorganismes 397 ± 15,0 et 515 ± 19,1 µg de P-A.D.N./100 mg de protéides ($p < 0,01$). Il semblerait donc exister dans les F.L une augmentation légère de l'A.R.N.; mais en

Tableau 15

Dosage de l'A.R.N. dans le Proteus P18 à l'aide de diverses méthodes.

Méthode à l'orcine	Méthode à la phloroglucine	Méthode par passage sur colonne de charbon
1.210	1.195	1.201
1.187	1.225	1.195
1.221	1.202	1.198
1.196	1.174	1.184

Valeurs exprimées en µg de P-A.R.N. pour 100 mg de protéides.

multipliant le nombre des expériences (voir tableau 17) cette différence n'apparaît pas significative (p: 0,05-0,10). Par contre, on note un accroissement de l'A.D.N. qui est significatif ($p < 0,01$). Cependant, le rapport P-A.R.N./P-A.D.N. en apparence inférieur pour les F.L (2,83) ne se distingue pas d'une façon significative de celui de Proteus (3,00).

En comparant les diverses fractions entre elles, nous voyons que la fraction III a la plus forte teneur en A.R.N., viennent ensuite les fractions II et I, suivies de la fraction IV totale et finalement de la IV filtrée (Fr. I/Fr. II: $p < 0,02$ Fr. II/Fr. III: $p < 0,01$). La teneur en A.D.N. est la plus forte dans les fractions I, II et IV filtrée; plus faible dans les fractions III et IV. Il en résulte que le rapport P-A.R.N./P-A.D.N. est le plus élevé pour les éléments petits (21,40) et le plus faible pour les formes invisibles au microscope à contraste de phase (0,73).

Tableau 16

Teneur en acides nucléiques du Proteus P18 et des diverses fractions des formes L.

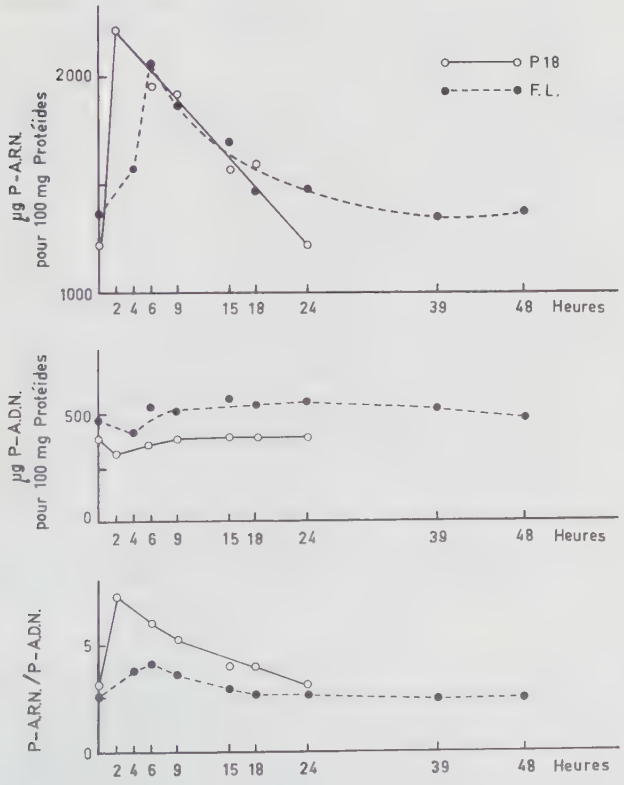
Organismes		Nbre Exp.	P-A.R.N.	P-A.D.N.	$\frac{\text{P-A.R.N.}}{\text{P-A.D.N.}}$
Proteus P18		12	1.190 ± 76	397 ± 15,0	3,00 ± 0,40
Formes L	Culture Entière	12	1.459 ± 41	515 ± 19,1	2,83 ± 0,37
	Fr. I	10	1.132 ± 99	520 ± 40,9	2,18 ± 0,29
	Fr. II	10	1.418 ± 222	485 ± 75,1	2,93 ± 0,39
	Fr. III	10	1.943 ± 125	91 ± 7,8	21,40 ± 0,60
	Fr. IV	6	439 ± 81	61 ± 6,4	7,20 ± 0,71
	Fr. IV filtrée	4	285 ± 28	389 ± 21,5	0,73 ± 0,08

Valeurs exprimées en μg de phosphore pour 100 mg de protéides.

B. — DETERMINATION QUANTITATIVE DE LA TENEUR EN ACIDES NUCLEIQUES, EN PROTEIDES ET EN LIPIDES DU PROTEUS P18 ET DES FORMES L AU COURS DE LA CROISSANCE.

De nombreuses recherches faites ces dernières années concernant les A.N. des bactéries ont montré que la teneur totale des A.N., ainsi que le rapport A.R.N./A.D.N. subissent de fortes variations au cours de la croissance bactérienne. Par conséquent, une étude comparative de la teneur en A.N. de deux formes microbiennes différentes doit porter également sur les teneurs en A.R.N., en A.D.N., ainsi que sur celles des protéides au cours de la prolifération de ces microorganismes. Nous avons déterminé parallèlement la variation du taux des lipides.

VARIATIONS QUANTITATIVES DE L'A.R.N. ET DE L'A.D.N.
DU PROTEUS P18 ET DES FORMES L AU COURS DE LA CROISSANCE



Graphique 6

Nos essais ont porté sur le bacille Proteus et les F.L totales cultivés dans le même milieu hypertonique. L'étude de la variation de la constitution chimique de ces microorganismes au cours de la croissance a été effectuée pour le bacille Proteus jusqu'à 24 heures et pour les F.L jusqu'à 48 heures.

Les résultats concernant les variations de la teneur en A.N. des microorganismes étudiés au cours de leur croissance sont exposés dans le tableau 17 et le graphique 6.

Il ressort de l'examen du tableau qu'en rapportant les valeurs à 100 mg de protéides, les teneurs en µg de P-A.R.N. oscillent dans le Proteus entre 1.208 ± 75 et 2.228 ± 206 et dans les F.L entre 1.373 ± 101 et 2.074 ± 95 (p: 0,05-0,10). C'est au début de la phase exponentielle que la différence est la plus accusée: 2.228 ± 206 chez le Proteus, contre 1.574 ± 101 dans les F.L. Pour ce qui est de l'A.D.N., en évaluant les résultats également pour 100 mg de protéides, on trouve pour le bacille des valeurs en µg de P-A.D.N. allant de

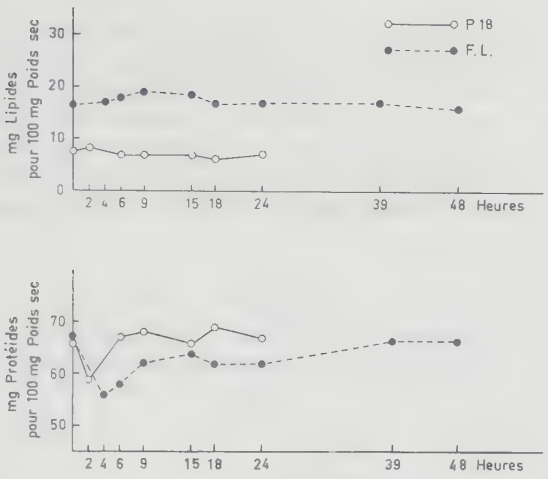
Tableau 17

Variations de la teneur en acides nucléiques du Proteus P18 et des formes L au cours de la croissance.

Age de la culture (heures)	P-A.R.N.		P-A.D.N.		P-A.R.N./P-A.D.N.	
	P18	F.L	P18	F.L	P18	F.L
2	2.228 ± 206		310 ± 28		7,20 ± 0,88	
4		1.574 ± 101		406 ± 53		3,88 ± 0,31
6	1.951 ± 276	2.074 ± 95	335 ± 37	513 ± 53	5,81 ± 0,49	4,04 ± 0,40
9	1.916 ± 291	1.876 ± 168	373 ± 44	508 ± 40	5,15 ± 0,53	3,69 ± 0,41
15	1.550 ± 145	1.700 ± 147	393 ± 33	564 ± 42	3,94 ± 0,43	3,02 ± 0,41
18	1.567 ± 107	1.476 ± 91	397 ± 31	521 ± 53	3,94 ± 0,37	2,84 ± 0,36
24	1.208 ± 75	1.491 ± 127	394 ± 29	530 ± 58	3,07 ± 0,20	2,82 ± 0,57
39		1.379 ± 41		510 ± 37		2,70 ± 0,42
48		1.373 ± 101		506 ± 34		2,72 ± 0,22

Valeurs exprimées en µg de phosphore pour 100 mg de protéides.
Nombre d'expériences effectuées: 12 pour le Proteus
8 pour les F.L

VARIATIONS QUANTITATIVES DES LIPIDES ET DES PROTEIDES DU PROTEUS P18 ET DES FORMES L AU COURS DE LA CROISSANCE



Graphique 7

310 ± 28 à 397 ± 31, alors que dans les F.L on note aux divers délais de la croissance des valeurs supérieures: 406 ± 53 à 564 ± 42 (p: < 0,01). Enfin, le rapport P-A.R.N./P-A.D.N. varie entre 3,07 ± 0,20 et 7,20 ± 0,88 dans la bactérie, 2,70 ± 0,42 et 4,04 ± 0,40 chez les F.L. Ainsi comme le laissait prévoir les valeurs individuelles, le rapport P-A.R.N./P-A.D.N. du Proteus se situe durant les phases de latence et logarithmique dans une zone supérieure à celle des F.L.

Les graphiques illustrent l'évolution des A.N. et indiquent que la valeur maximum d'A.R.N. est atteinte au bout de 2 heures chez le Proteus et 6 heures dans les F.L. Les teneurs en P-A.D.N. dans le bacille et les F.L. progressent lentement jusqu'à 15 heures, puis restent constantes. Les courbes représentant les variations du rapport P-A.R.N./P-A.D.N. montrent une similitude pour les deux micro-organismes: les valeurs augmentent jusqu'au début de la phase logarithmique pour décroître ensuite.

Le tableau 18 et le graphique 7 indiquent les variations du taux des protéides et des lipides au cours de la croissance du Proteus et des F.L.

Il ressort de l'examen du tableau que pour le Proteus la teneur en protéides oscille entre 58,9 ± 1,9 et 69,1 ± 2,3 pour 100 mg de poids sec et dans les F.L entre 56,0 ± 1,9 et 66,6 ± 2,3. Le taux des lipides varie entre 6,68 ± 1,29 et 7,85 ± 0,3 pour 100 mg de poids sec chez la bactérie et entre 16,3 ± 1,8 et 19,1 ± 1,48 dans les F.L.

Les courbes montrent que le taux des protéides, après une chute importante pendant la phase de latence *), augmente durant la phase logarithmique et atteint la valeur maximum au début de la phase stationnaire. Les chiffres moyens des F.L. sont toujours légèrement inférieurs à ceux du Proteus aux diverses périodes examinées. Les teneurs en lipides ne subissent pas de variations importantes tel qu'il en ressort de l'examen du graphique. Ces teneurs sont légèrement plus élevées au début de la croissance exponentielle, puis elles diminuent; à partir de 6 heures pour le Proteus et 18 heures pour les F.L les valeurs restent constantes. Pendant toute la durée du développement, la quantité de lipides des F.L reste supérieure à celle du bacille.

Tableau 18

Variations de la teneur en protéides et en lipides du Proteus P18 et des formes L au cours de la croissance.

Age de la culture (heures)	Protéides		Lipides	
	P18	F.L	P18	F.L
2	58,9 ± 1,9		7,85 ± 0,3	
4		56,0 ± 1,9		17,3 ± 1,09
6	66,7 ± 3,0	58,0 ± 3,5	6,80 ± 0,11	18,0 ± 2,80
9	68,0 ± 4,2	62,0 ± 2,9	6,70 ± 0,47	19,1 ± 1,48
15	66,1 ± 3,9	64,3 ± 4,0	6,80 ± 0,29	18,6 ± 0,88
18	69,1 ± 2,3	62,3 ± 3,5	6,68 ± 1,29	17,1 ± 0,93
24	67,1 ± 3,7	62,5 ± 3,5	6,89 ± 1,88	16,8 ± 1,30
39		66,6 ± 2,3		17,4 ± 2,00
48		66,5 ± 2,9		16,3 ± 1,80

Valeurs exprimées en mg pour 100 mg de poids sec.
Nombre d'expériences effectuées: 12 pour le Proteus
10 pour les F.L

*) A zéro heure les taux de protéides pour 100 mg de poids sec sont respectivement pour le bacille et les F.L de 66,5 et de 66,8 mg.

III. ÉTUDE COMPARÉE DES TENEURS EN A. R. N. ÉLÉMENT MICROBIEN.

Il était intéressant de connaître la quantité d'A.R.N. et d'A.D.N. par bactérie et par élément des diverses espèces morphologiques des F.L. Nous avons étudié pour cela deux types de F.L: les F.L stables et les F.L réversibles.

Le Proteus P 18 et les F.L sont cultivés dans le milieu hypertonique. Les F.L réversibles sont obtenues d'abord sur milieu solide, ensuite repiquées en milieu liquide hypertonique.

Les microorganismes sont récoltés dans la phase stationnaire, c'est-à-dire à 24 heures pour le Proteus et à 48 heures pour les F.L stables. Les F.L réversibles sont prélevées déjà après 24 heures d'incubation en raison de leur réversion vers la bactérie normale à des périodes plus tardives. Les F.L sont soumises au fractionnement en leurs divers types morphologiques d'après la méthode décrite plus haut. La fraction IV étant invisible au microscope optique, n'a pas été étudiée.

Le comptage des bactéries et des éléments des fractions I, II et III est effectué au microscope à contraste de phase dans la cellule de Thoma, en comptant un minimum de 1.000 éléments.

Les résultats sont consignés dans le tableau 19. Pour les F.L stables qui donnent facilement une culture abondante, les essais ont porté sur les trois fractions. Les déterminations sur les F.L réversibles ont été effectuées uniquement sur la fraction III, la plus abondante dans nos cultures, qui nous paraît être la plus intéressante d'après les résultats des déterminations d'activités enzymatiques des F.L. stables.

En examinant le tableau, nous voyons qu'un élément de la fraction I (forme globuleuse grande) contient en moyenne 52 fois plus d'A.R.N. que la bactérie; le taux d'A.R.N. d'un élément de la fraction II (forme de taille moyenne) ou de la fraction III (petite forme) est du même ordre de grandeur que celui de la forme bactérienne. Pour ce qui est de l'A.D.N., il apparaît un fait fondamental: alors que les grandes formes contiennent en moyenne 76 fois plus d'A.D.N. que les bactéries et les formes moyennes 2 fois plus, les formes petites ne renferment qu'un tiers de la teneur en A.D.N. du bacille Proteus.

Mais pour avoir des valeurs comparables, il convenait de connaître la teneur en A.D.N. d'un noyau bactérien. Le Proteus contenant souvent plus d'un noyau (1 à 4 noyaux), nous avons déterminé leur nombre par élément bactérien selon la technique de Robinow (86) suivie d'une coloration au Giemsa.

Dans la phase stationnaire, la culture de Proteus P 18 contient 69,2 pour cent d'éléments à 1 noyau, 20,6 pour cent à 2 noyaux,

Tableau 19

Quantité de P-A.R.N. et P-A.D.N. par bactérie et par élément des formes L de diverses tailles.

	Proteus P18 24 h. µg/bactérie	F.L stables 48 h			F.L réversibles 24 h. Fr. III µg/élément
		Fr. I µg/élément	Fr. II µg/élément	Fr. III µg/élément	
Nombre d'expériences	5	3	3	3	3
P-A.R.N. Moyenne	$5{,}3 \times 10^{-9}$ ± 0,77 *)	260×10^{-9}	9×10^{-9}	$7{,}1 \times 10^{-9}$	$6{,}84 \times 10^{-9}$
Valeurs extrêmes		240 — 280	8 — 11	4,9 — 12,9	4,66 — 9,35
P-A.D.N. Moyenne	$1{,}7 \times 10^{-9}$ ± 0,2 *)	127×10^{-9}	3×10^{-9}	$0{,}46 \times 10^{-9}$	$0{,}37 \times 10^{-9}$
Valeurs extrêmes		120 — 130	2 — 4	0,30 — 0,68	0,18 — 0,64

*) Les erreurs standards ont été calculées uniquement dans le cas où nous avons effectué 5 expériences.
Nombre de fioles de ROUX contenant 120 ml de milieu nutritif utilisées par expérience:
3 pour le Proteus;
9 pour les F.L.

Tableau 20

Répartition des ribonucléotides de l'acide ribonucléique du Proteus P18 et des formes L.

Organismes	Nombre Exp.	Molécules pour 100 molécules de nucléotides				Pu/Py	6-amino / 6-céto
		GMP	AMP	CMP	UMP		
Proteus P18	9	29,0 ± 0,17	27,0 ± 0,37	21,0 ± 0,75	23,0 ± 0,37	1,27 ± 0,037	0,92 ± 0,024
Formes L	5	29,0 ± 0,70	26,4 ± 0,89	21,4 ± 0,89	23,2 ± 0,45	1,24 ± 0,041	0,92 ± 0,032

Pu/Py = Rapport des nucléotides puriques aux nucléotides pyrimidiques (GMP + AMP / CMP + UMP).
6-amino/6-céto = Rapport des nucléotides 6-aminés aux nucléotides 6-cétoniques (AMP + CMP / GMP + UMP).

6,7 pour cent à 3 noyaux et 3,5 pour cent à 4 noyaux; ce qui représente un total de 150 noyaux pour cent bactéries. Nous n'avons pas évalué le nombre de noyaux présents dans les divers éléments des F.L. D'après la littérature on sait que les corps globuleux grands sont multinucléés (105, 76), tandis que les formes petites ne possèdent qu'un seul noyau (108).

La quantité de P-A.D.N. par noyau bactérien est en moyenne de $1{,}13 \times 10^{-9}$ µg. En comparant cette valeur aux résultats obtenus pour les divers types morphologiques des F.L, nous constatons que les formes grandes contiennent 112 fois plus d'A.D.N., les formes moyennes 2,66 fois plus d'A.D.N. que le noyau bactérien, et les formes petites tant stables que réversibles en renferment approximativement la moitié. Or, les éléments de la fraction III peuvent reconstituer des bactéries normales, comme nous l'avons expérimentalement mis en évidence avec les F.L réversibles de cette même fraction, en les réensemençant par micromanipulation dans du bouillon ne contenant pas de pénicilline. Nous pouvons ainsi dire que la quantité minimum d'A.D.N. nécessaire pour redonner une bactérie est approximativement la moitié de l'A.D.N. du noyau bactérien dans la phase stationnaire.

IV. ÉTUDE DE LA COMPOSITION DE L'ENSEMBLE DES ACIDES RIBONUCLEIQUES ET DE L'ACIDE DESOXYRIBONUCLEIQUE DU BACILLE PROTEUS P 18 ET DES FORMES L STABLES.

A. — ETUDE DE LA REPARTITION DES RIBONUCLEOTIDES DE L'A.R.N.

De nombreux auteurs ont étudié la constitution de l'A.R.N. des microorganismes par chromatographie sur papier (21, 80, 57, 98, 116, 60, 32, 100, 7). Il ressort de tous ces travaux que les variations dans la répartition des nucléotides de l'A.R.N. sont faibles d'une espèce bactérienne à l'autre. Une certaine régularité dans la composition de l'A.R.N. se traduisant par l'équation $G + U = A + C$ signalée par Elson et Chargaff (21) a été parfois confirmée.

Cependant, nous n'avons trouvé aucune indication concernant les F.L. Il existe des écarts importants dans la teneur en A.R.N. de la bactérie et de certaines espèces morphologiques des F.L. Aussi nous a-t-il paru intéressant de rechercher s'il y avait également une différence qualitative. Ceci d'autant plus que Spirin et coll. (97) ont signalé que la transformation de la bactérie en forme atypique n'entraîne aucune altération de la composition de l'A.R.N.

Nous avons étudié la répartition des nucléotides de l'A.R.N. dans le bacille Proteus et dans les F.L d'abord par chromatographie sur papier pour les cultures selon Tulasne, ensuite par électrophorèse

pour les cultures en suspension. Comme les différences entre les résultats obtenus par ces deux méthodes ne sont pas significatives, nous avons adopté par la suite la technique électrophorétique plus rapide et nécessitant moins de substance pour l'analyse de l'A.R.N. des diverses fractions des F.L.

1° Etude comparée de l'A.R.N. du Proteus et des F.L. cultivées en surface (culture en voile).

Notre étude comparée de la constitution qualitative de l'A.R.N. du Proteus et des F.L est effectuée sur des microorganismes en phase stationnaire. Rappelons à cet égard que Spirin et coll. (98), Wade et Morgan (116) et Stuy (100) ont montré que la répartition des nucléotides de l'A.R.N. ne varie pas avec l'âge de la culture bactérienne. Le bacille Proteus ensemencé dans du bouillon ordinaire contenant 20 pour cent de sérum de cheval est récolté après 24 heures de séjour à 37° C. Les F.L stables cultivées en surface selon Tulasne sont récoltées au bout de 5 jours.

La répartition des nucléotides est déterminée à l'aide de la technique de chromatographie sur papier.

Dans une étude de l'A.R.N. global, il importe de ne pas perdre une partie de cet A.R.N., car cela pourrait modifier l'image de la répartition des divers nucléotides. Nous avons donc vérifié que notre méthode n'entraînait pas de pertes en cours de manipulation. Aussi avons-nous fait le bilan de l'ensemble des composés phosphorés de la fraction contenant les ribonucléotides. Pour cela les quantités de phosphore dans l'hydrolysat alcalin contenant les ribonucléotides et dans l'essai prêt pour la chromatographie ont été déterminées. Nous avons ainsi obtenu une récupération de 93,2 pour cent, ce qui peut être considéré comme très satisfaisant face aux pertes provoquées par la préparation et la purification de l'A.R.N. d'un tissu ou des microorganismes. Cette technique, pratiquée dans notre laboratoire, fournit des résultats valables même avec de faibles quantités de substances.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 20. Ces valeurs sont calculées d'après l'absorption dans l'ultra-violet; nous les avons vérifiées par dosage du phosphore et en général l'accord est bon.

2° Etude comparée de l'A.R.N. du Proteus et des diverses fractions des F.L. cultivées en suspension dans le milieu hypertonique.

Les microorganismes sont prélevés durant la phase stationnaire, c'est-à-dire à 24 heures pour la bactérie et à 48 heures pour les F.L.

Nous avons obtenu une récupération de 93 pour cent dans la préparation et la purification de l'A.R.N. La répartition des nucléotides est déterminée par la méthode électrophorétique.

Les résultats sont présentés dans le tableau 21. Les valeurs données par dosage du phosphore sont en concordance avec celles du tableau.

L'examen des tableaux 20 et 21 montre que la composition de l'A.R.N. est identique aux erreurs d'expériences près dans le Proteus et les F.L totales. En ce qui concerne les divers types morphologiques des F.L, les fractions I, II et III ne présentent aucune différence dans la répartition de leurs nucléotides de l'A.R.N. Par contre, la fraction IV (formes naines) a une teneur plus faible en acide adénylique et plus forte en acide guanylique.

B. — REPARTITION DES BASES PURIQUES ET PYRIMIDIQUES DE L'ACIDE DESOXYRIBONUCLEIQUE.

La constitution de l'A.D.N. des microorganismes a fait l'objet de nombreuses études (84, 44, 98, 60, 100, 7). Selon la prédominance de l'adénine et de la thymine, ou de la guanine et de la cytosine, on distingue deux types d'A.D.N., l'un désigné par le terme «AT», l'autre par le terme «GC» (CHARGAFF). Chez les microorganismes on trouve tous les intermédiaires depuis le «type AT» jusqu'au «type GC».

Jusqu'à présent, aucun travail n'a été effectué concernant la répartition des bases azotées de l'A.D.N. des F.L. Ayant trouvé une teneur en A.D.N. plus élevée dans les F.L que dans la bactérie, il nous a paru intéressant d'aborder une étude qualitative de cet A.D.N. dans les deux microorganismes.

Nous avons entrepris cette étude sur le bacille Proteus et les F.L totales cultivées dans le milieu hypertonique. Les microorganismes sont prélevés au bout de 24 heures pour la bactérie et 48 heures pour les F.L, ce qui correspond à la phase stationnaire de leur développement. Rappelons que la composition de l'A.D.N., en fonction de l'âge de la culture, reste invariable (84, 98, 44, 126). Nous avons séparé les bases de l'A.D.N. par la méthode de chromatographie sur papier.

Les résultats sont donnés dans le tableau 22.

Il ressort de cette étude qu'il n'y a pas de différence significative dans la constitution globale de l'A.D.N. des bactéries et des F.L étudiées.

V. ÉTUDE DU MÉTABOLISME DES ACIDES NUCLEIQUES DU BACILLE PROTEUS P 18 ET DES FORMES L STABLE.

En vue de l'étude comparée du métabolisme des A.N. du Proteus et les F.L, nous avons cultivé bactéries et F.L dans le même milieu hypertonique additionné de $^{32}PO_4H_3$. A cette occasion, nous avons constaté des modifications morphologiques du bacille que nous allons exposer.

Tableau 21

Répartition des ribonucléotides de l'acide ribonucléique du Proteus P18 et des diverses fractions des formes L.

Organismes		Nombre Exp.	Molécules pour 100 molécules de nucléotides				Pu/Py	6-amino / 6-céto
			CMP	AMP	GMP	UMP		
Proteus P18		4	19,9 ± 1,20	26,9 ± 0,97	28,5 ± 0,39	24,7 ± 1,36	1,24 ± 0,060	0,88 ± 0,033
Formes L	Culture entière	7	21,7 ± 1,72	27,4 ± 1,02	28,3 ± 1,31	22,6 ± 1,27	1,26 ± 0,066	0,97 ± 0,038
	Fr. I	6	22,2 ± 0,97	26,2 ± 1,24	29,6 ± 1,3	22,0 ± 0,92	1,27 ± 0,054	0,94 ± 0,027
	Fr. II	4	23,0 ± 1,51	26,5 ± 0,92	29,1 ± 1,08	21,4 ± 0,90	1,25 ± 0.052	0,98 ± 0,025
	Fr. III	3	22,0 *) 21,8-22,2	27,3 27,2-27,5	29,3 29,2-29,5	21,4 21,3-21,5	1,30 1,29-1,31	0,97 0,95-0,99
	Fr. IV	2	20,6 *) 19,5-21,4	24,3 24,1-24,5	33,1 32,6-33,7	22,0 20,3-23,8	1,35 1,31-1,39	0,82 0,78-0,86

*) Valeurs extrêmes Pu/Py = Rapport des nucléotides puriques aux nucléotides pyrimidiques (GMP + AMP / CMP + UMP).
6-amino/6-céto = Rapport des nucléotides 6-aminés aux nucléotides 6-cétoniques (AMP + CMP / GMP + UMP).

Tableau 22

Répartition des bases puriques et pyrimidiques de l'acide désoxyribonucléique du Proteus P18 et des formes L.

Organismes	Nombre Exp.	Molécules pour 100 molécules de bases				Pu/Py	6-amino / 6-céto	A + T / G + C
		G	A	C	T			
Proteus P18	8	19,4 ± 1,78	29,2 ± 1,21	20,6 ± 1,31	30,8 ± 2,44	0,95 ± 0,064	1,00 ± 0,078	1,50 ± 0,092
Formes L	8	18,2 ± 0,86	29,6 ± 1,88	21,0 ± 0,51	31,2 ± 1,62	0,92 ± 0,047	1,02 ± 0,053	1,55 ± 0,069

Pu/Py = Rapport des bases puriques aux bases pyrimidiques (G + A / C + T).
6-amino/6-céto = Rapport des bases 6-aminées aux bases 6-cétoniques (A + C / G + T).

A. — ACTION DU PHOSPHORE RADIO-ACTIF SUR LE BACILLE PROTEUS P18.

En présence de doses relativement faibles de phosphore radioactif, la multiplication et l'aspect morphologique de la bactérie sont modifiés. Nous avons donc été amené à suivre les transformations au microscope à contraste de phase. Le Proteus est cultivé dans du bouillon contenant 20 pour cent de sérum de cheval, du saccharose 0,3 M et des doses variées de $^{32}PO_4H_3$ (4 à 40 μc pour 100 ml de milieu). C'est en présence d'une dose de 8 μc de phosphore radioactif que le phénomène de transformation morphologique est apparu le plus caractéristique.

Quatre à six heures après l'ensemencement, à côté de la forme bacillaire normale, apparaissent des filaments longs de 20 à 80 μ, animés de mouvements rapides de reptation (Fig. 20b). Entre 6 et 8 heures, on observe des filaments portant à l'une de leur extrémité une formation globulaire et se déplaçant rapidement, la boule en avant (Fig. 20c). Au bout de 10 heures sont visibles des éléments ronds et opaques de 1 à 8 μ de diamètre, ainsi que des filaments à renflement médian (Fig. 20d). A ce moment les bacilles normaux sont très rares, alors que les filaments longs sont nombreux.

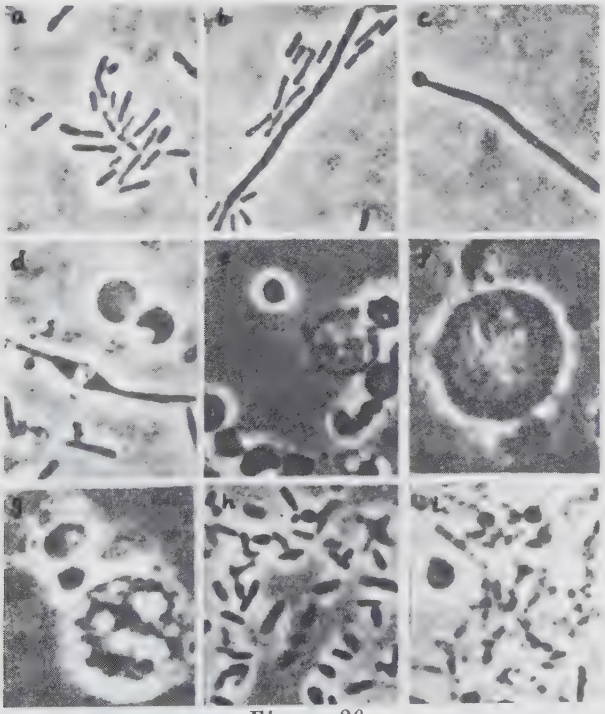


Figure 20

(a) Proteus normal; (b-i) voir texte. — Contraste de phase (× 500).

Certaines formations globulaires portent un appendice petit et très fin en spirale. Après 15 heures apparaissent des éléments globuleux de 8 μ de diamètre et de fines particules qui sont à la limite de la visibilité (Fig. 20e). Au bout d'environ 21 heures, les cultures ne contiennent plus que des formes globulaires de 30 à 40 μ de diamètre, renfermant des granulations et des vacuoles (Fig. 20f et g). Les petits granules qui sont à la limite de la visibilité sont alors très nombreux. Lorsqu'on prolonge le temps d'incubation, les grandes formes rondes se font plus rares et sont remplacées par un nombre considérable d'éléments plus petits. Après 31 à 48 heures, il se produit une régression: des filaments longs, d'autres courts et gros apparaissent, ainsi que des formes bacillaires normales (Fig. 20h).

Toutes ces transformations que subit la bactérie sont illustrées par la figure 20.

Les éléments granulaires à la limite de la visibilité n'ont pas pu être photographiés à cause de leur agitation constante due au mouvement brownien.

Si une culture mise en présence de 8 μc de ^{32}P et âgée de 21 heures, donc riche en formations globulaires, est réensemencée dans du bouillon hypertonique contenant la même quantité de phosphore radio-actif, on obtient uniquement les mêmes formes rondes. Un deuxième repiquage effectué dans des conditions identiques montre de nombreuses formes globulaires éclatées, ainsi que des filaments et des bâtonnets. Au troisième repiquage, les éléments ronds disparaissent complètement et la culture se compose de filaments courts et de bacilles normaux. Des réensemencements successifs en présence de phosphore radio-actif donnent une culture constituée essentiellement par des formes bactériennes normales. La figure 20i montre une telle culture.

Des transformations analogues se produisent avec des doses plus élevées de ^{32}P (10 à 16 μc pour 100 ml de milieu); mais elles s'effectuent alors à un rythme beaucoup plus rapide, qu'il s'agisse de la formation d'éléments anormaux ou de leur régression vers la forme bacillaire normale. Pour des quantités de 28 à 40 μc, il ne se forme pas de longs filaments à renflements, ni de formes globulaires grandes, on observe uniquement de longs filaments et de petites formes globuleuses et la culture réverse rapidement vers la forme normale. D'autre part, les fortes doses de phosphore radio-actif que nous avons appliquées diminuent la vitesse de multiplication des bactéries et la croissance s'arrête au bout de 12 heures.

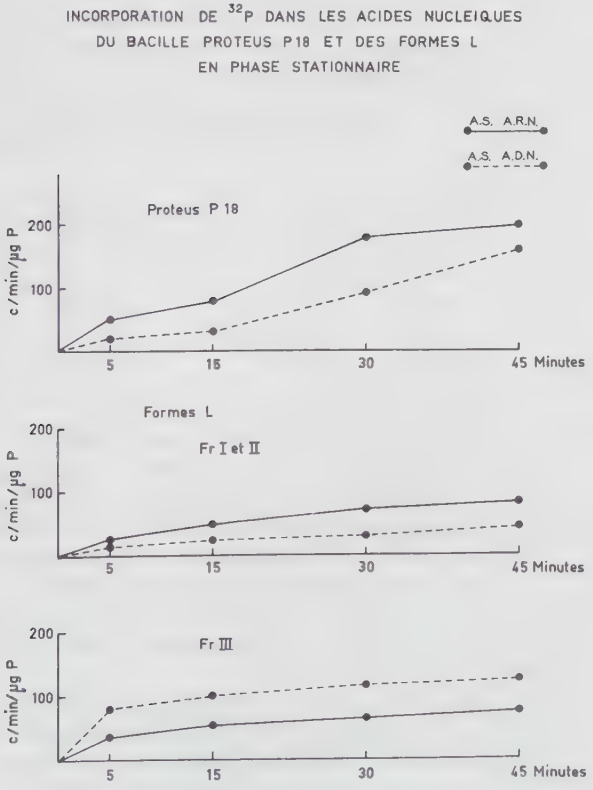
B. — ETUDE DE L'INCORPORATION DU ^{32}P DANS LE PROTEUS P18 ET LES FORMES L EN PHASE STATIONNAIRE.

L'étude du renouvellement des acides nucléiques dans les microorganismes a fait l'objet de nombreux travaux (28, 26, 27, 3, 31, 66, 24, 65). Tous les auteurs sont d'accord pour dire qu'il n'y a pas de

renouvellement des acides nucléiques dans les microorganismes durant la phase de croissance exponentielle, alors que pendant la phase stationnaire, il serait relativement important. C'est la raison pour laquelle nous avons étudié le renouvellement à l'aide de phosphore radio-actif pendant la phase stationnaire du bacille Proteus P18 et des F.L stables qui en dérivent. Dans une première étape, nous avons examiné l'incorporation du phosphore radio-actif durant cette phase.

Nous avons étudié le cas du bacille Proteus, d'une fraction des F.L contenant les formes grandes et moyennes (2,0 — 11,4 μ, fraction I + II) et d'une autre renfermant les éléments petits (1,0 — 2,0 μ, fraction III).

Les résultats de nos essais sont représentés dans le graphique 8 et le tableau 23. Nous avons effectué 10 expériences avec le Proteus, 8 expériences avec la fraction I + II et 6 seulement avec la fraction III, étant donné le taux relatif de cette dernière fraction et la difficulté d'avoir des quantités suffisamment importantes d'éléments de la fraction III.



Graphique 8

Tableau 23

Activités spécifiques des acides nucléiques du Proteus P18 et des formes L.

Organismes	A.S. A.R.N.				A.S. A.D.N.			
	Temps d'incubation en minutes							
	5	15	30	45	5	15	30	45
Proteus	48,2 ±11,4	79,2 ± 17	181 ± 32	201 ± 41	19,5 ± 3,0	33,2 ± 12	92,2 ± 20	158,2 ± 46
Fr. I + II	26,0 ± 8,5	48,2 ± 10	71,4 ± 9,0	84,5 ± 12	13,0 ± 3,0	23,2 ± 3,8	30,0 ± 6,0	45,5 ± 9,8
Fr. III	34,2 ± 9,0	54,0 ± 15	66,0 ± 18	75,0 ± 16	77,9 ± 22	100 ± 34	116 ± 44	125 ± 36

Valeurs exprimées en c/min/µg P.

Tableau 24

Activités spécifiques relatives des acides nucléiques de Proteus P18 et des formes L.

Organismes	A.S. A.R.N. / A.S. Nucléotides libres		A.S. A.D.N. / A.S. Nucléotides libres	
	Temps d'incubation en minutes			
	5	30	5	30
Proteus	0,445 ± 0,09	0,515 ± 0,08	0,197 ± 0,04	0,264 ± 0,05
Fr. I + II	0,037 ± 0,007	0,070 ± 0,01	0,019 ± 0,003	0,029 ± 0,005
Fr. III	0,040 ± 0,005	0,043 ± 0,007	0,071 ± 0,009	0,076 ± 0,01

Le graphique montre que l'activité spécifique de l'A.R.N. du Proteus est à chaque période supérieure à celui des divers types morphologiques des F. L étudiées, alors qu'entre les deux fractions des F.L la différence est relativement peu accusée (voir tableau 23). Par contre, pour ce qui est de l'A.D.N., seules les activités spécifiques de la fraction I + II sont inférieures à celles du Proteus. Celles de la fraction III sont aux délais de 5, 15 et 30 minutes nettement supérieures à celles de la bactérie normale tandis qu'à 45 minutes la valeur est inférieure.

En tenant compte de l'activité spécifique des nucléotides libres et en évaluant l'activité spécifique des A.N. par rapport à celles des nucléotides libres (activité spécifique relative) on note aux deux périodes examinées (5 et 30 minutes) une activité bien plus élevée dans la bactérie que dans les F.L (tableau 24).

C. — ETUDE DU RENOUVELLEMENT DES ACIDES NUCLEIQUES DU PROTEUS P18 ET DES FORMES L PENDANT LA PHASE STATIONNAIRE.

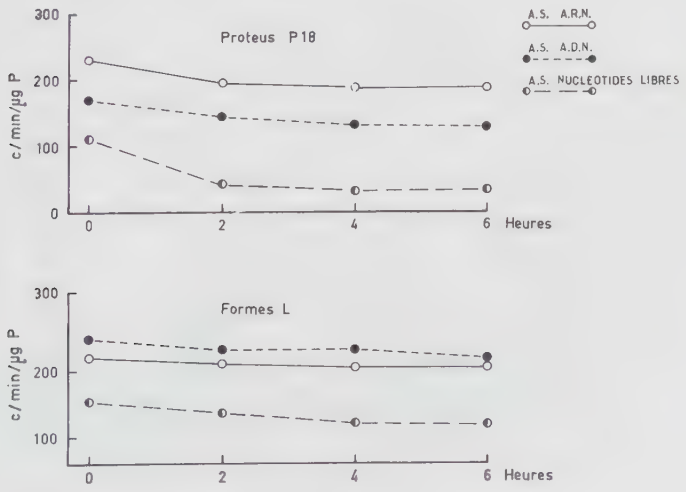
L'on sait que pour une étude du renouvellement, l'analyse de la sortie de l'élément radio-actif des constituants biochimiques est plus significative. Nous avons étudié cette décroissance de la radio-activité des acides ribo- et désoxyribonucléiques et des nucléotides libres de l'acido-soluble après incubation préalable des microorganismes dans un milieu contenant du $^{32}PO_4H_3$.

Les résultats provenant de six expériences sont consignés dans le graphique 9.

De l'examen du graphique il ressort, que la décroissance de l'activité de l'A.R.N., de l'A.D.N. et des nucléotides libres du Proteus est relativement rapide pendant les deux premières heures, se ralentit durant les deux heures qui suivent et s'efface au bout de 4 heures d'incubation dans un milieu exempt d'élément radio-actif. En ce qui concerne les F.L., la décroissance de la radio-activité est beaucoup plus lente déjà au délai de 2 heures.

Il ressort de l'ensemble de notre étude sur les A.N., que leur biosynthèse au cours de la croissance est plus rapide dans le bacille que dans les F.L. D'autre part, il se confirme que le renouvellement des A.N. dans les F.L est inférieur à celui de la bactérie.

DECROISSANCE DE LA RADIO-ACTIVITE DES ACIDES NUCLEIQUES ET LEURS PRECURSEURS DU BACILLE PROTEUS P18 ET DES FORMES L EN PHASE STATIONNAIRE



Graphique 9

VI. ÉTUDE DE QUELQUES ACTIVITÉS MÉTABOLIQUES DU BACILLE PROTEUS P 18 ET DES FORMES L STABLES.

Nous avons étudié comparativement la consommation d'oxygène, ainsi que quelques activités enzymatiques du bacille Proteus P 18, des F.L totales et des diverses espèces morphologiques de ces dernières. Pour chaque activité métabolique et pour chacun des types de microorganismes, nous avons effectué une dizaine de déterminations.

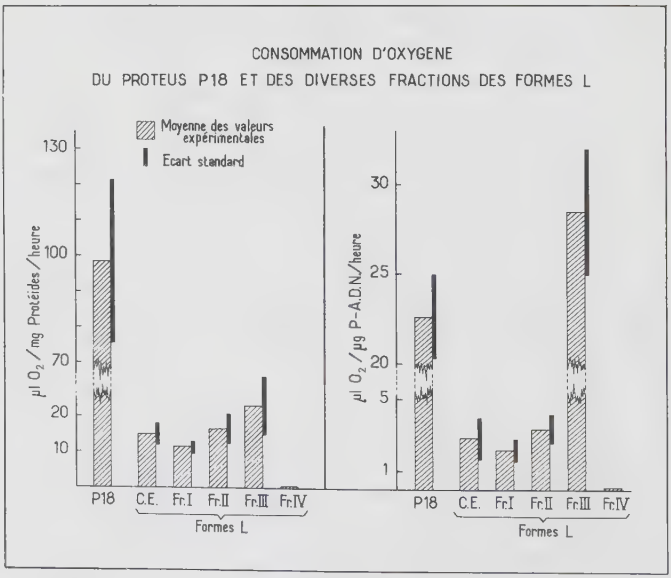
Les bactéries et les F.L sont cultivées dans le milieu hypertonique et incubées à 37° C. Les essais ont porté sur les microorganismes en phase stationnaire: le Proteus est récolté après 18 heures de culture et les F.L au bout de 48 heures. Ces dernières sont soumises aux centrifugations différentielles, afin d'isoler les quatre fractions.

A. — ETUDE DE LA CONSOMMATION D'OXYGENE.

La respiration est mesurée à l'appareil de Warbourg en milieu de Ringer-Krebs glucosé et oxygéné.

Les résultats sont donnés par le graphique 10.

La consommation d'oxygène du Proteus est de 98,5 ± 23 µl d'oxygène par heure et par mg de protéides; celle des cultures totales de F.L est de 14,9 ± 2,83. Rapportées au µg de P-A.D.N.,



Graphique 10

les valeurs de la consommation d'oxygène sont respectivement pour les deux types de microorganismes de 22,6 ± 2,3 et 2,9 ± 1,18. En ce qui concerne les diverses espèces morphologiques des F.L, la fraction I consomme 11,4 ± 2,02 µl d'oxygène par heure et par mg de protéides; la fraction II 16,5 ± 4,3; la fraction III 23,4 ± 8,2 et la fraction IV présente une valeur nulle de consommation d'oxygène, malgré des quantités relativement importantes de microorganismes utilisés. Exprimée pour 1 µg de P-A.D.N., la consommation d'oxygène est de 2,2 ± 0,63 pour la fraction I; de 3,4 ± 0,84 pour la fraction II; de 28,5 ± 3,5 pour la fraction III et nulle pour la fraction IV.

B. — ETUDE DE QUELQUES ACTIVITES ENZYMATIQUES.

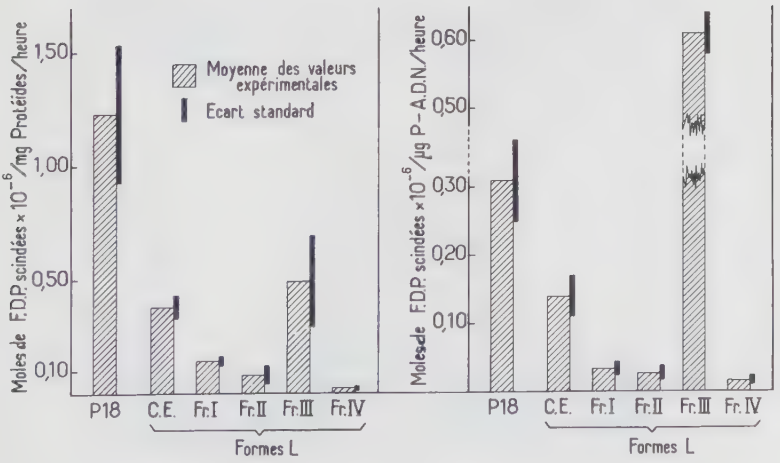
1° Activité aldolasique.

Nous avons évalué l'activité aldolasique du Proteus, des F.L totales et de leurs divers types morphologiques et avons effectué dans chaque cas dix déterminations.

Les résultats obtenus sont illustrés par le graphique 11.

Les quantités de F.D.P. scindées par l'aldolase rapportées à un mg de protéides des microorganismes et par heure est en moyenne de $1{,}23 \times 10^{-6}$ moles pour le Proteus et de $0{,}38 \times 10^{-6}$ moles pour les F.L totales. Exprimées pour 1 µg de P-A.D.N., les valeurs sont pour la bactérie et les F.L totales respectivement de $0{,}312 \times 10^{-6}$ moles et $0{,}14 \times 10^{-6}$ moles. Le taux de F.D.P scindées par l'aldolase des diverses espèces morphologiques est en moyenne de $0{,}14 \times 10^{-6}$ moles par heure par mg de protéides pour la fraction I, de $0{,}08 \times 10^{-6}$

ACTIVITE ALDOLASIQUE
DU PROTEUS P18 ET DES DIVERSES FRACTIONS DES FORMES L



Graphique 11

moles pour la fraction II, de 0,49 $\times$ 10^{-6} moles pour la fraction III et de 0,01 $\times$ 10^{-6} moles pour la fraction IV. Rapportées au µg de P-A.D.N., on trouve respectivement pour ces différentes fractions les valeurs de 0,034 $\times$ 10^{-6} moles; 0,027 $\times$ 10^{-6} moles; 0,61 $\times$ 10^{-6} moles et 0,016 $\times$ 10^{-6} moles.

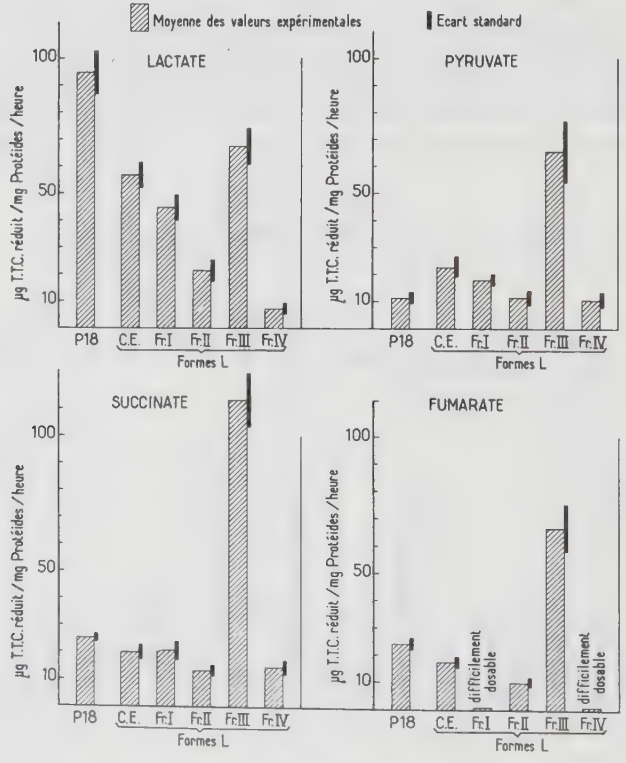
2° **Activités déshydrogénasiques.**

Nous avons déterminé les activités déshydrogénasiques en présence des substrats suivants: succinate, fumarate, pyruvate et lactate de sodium.

Les résultats de nos essais sont représentés dans les graphiques 12 et 13.

La quantité de T.T.C. réduit en présence des divers substrats: lactate, pyruvate, succinate et fumarate est respectivement en moyenne de 94,0; 11,3; 25,6 et 24,0 µg/mg de protéides/heure pour le bacille; de 56,8; 22,9; 20,2 et 17,6 pour les F.L totales. Ramenées au

ACTIVITE DESHYDROGENASIQUE DU PROTEUS P18
ET DES DIVERSES FRACTIONS DES FORMES L EN PRESENCE DE DIVERS SUBSTRATS



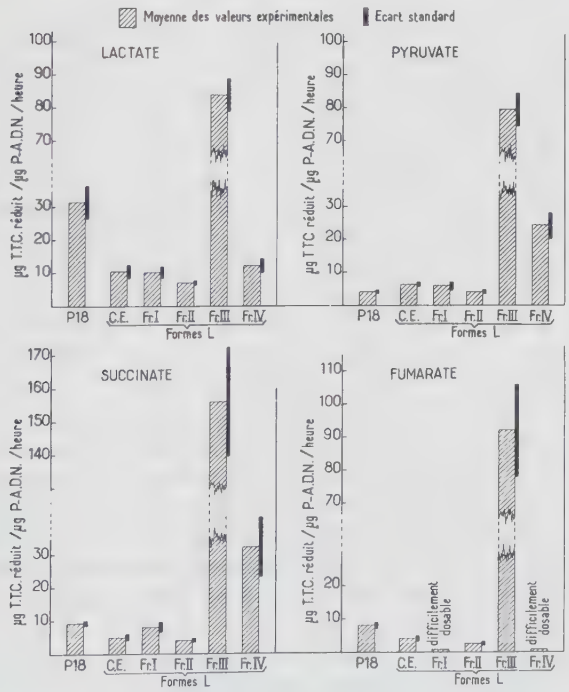
Graphique 12

µg de P-A.D.N., les quantités de T.T.C. réduit sont en moyenne de 31,5; 4,27; 9,41 et 7,91 pour la bactérie et de 10,5; 6,4; 4,9 et 3,8 pour les F.L totales respectivement en présence des différents substrats.

En ce qui concerne les diverses fractions des F.L., les quantités de T.T.C. réduit par heure et exprimées par mg de protéides sont en moyenne pour la fraction I de 44,6; 17,7; 20,9 et presque nulle; pour la fraction II de 21,6; 11,5; 13,8 et 10,5; pour la fraction III de 67,0; 65,5; 114 et 69,4; pour la fraction IV de 7,5 10,8; 14,8 et presque nulle respectivement en présence de lactate, de pyruvate, de succinate et de fumarate. Rapportée au µg de P-A.D.N., la quantité de T.T.C. réduit est en moyenne et respectivement en présence des quatre substrats de 10,3; 5,8; 7,9 et nulle pour la fraction I; de 7,2; 3,6; 3,6 et 2,5 pour la fraction II; de 84; 79,5; 156 et 92,9 pour la fraction III; de 12,3; 20,4; 32,1 et nulle pour la fraction IV.

L'étude de la consommation d'oxygène et de ces quelques activités enzymatiques montre des différences notables que nous discuterons entre le bacille Proteus et les F.L totales et au sein des F.L entre les divers types morphologiques.

ACTIVITE DESHYDROGENASIQUE DU PROTEUS P18
ET DES DIVERSES FRACTIONS DES FORMES L EN PRESENCE DE DIVERS SUBSTRATS



Graphique 13

TROISIEME PARTIE.

DISCUSSION

Nous analyserons les résultats rapportés dans le chapitre précédent, tenant compte non seulement des travaux antérieurs, mais également des publications postérieures à nos constatations, qui ont confirmé dans une large mesure nos données expérimentales.

I. ÉTUDE MORPHOLOGIQUE DES FORMES L.

A. — LA CULTURE DES FORMES L EN MILIEU HYPERTONIQUE. LE RENDEMENT.

La transformation de la bactérie en F.L nécessite un milieu solide. Aussi pour les nombreuses études morphologiques qui ont été effectuées sur les F.L, ces dernières étaient le plus souvent cultivées sur gélose molle. Certains auteurs (34) ont utilisé ce procédé et examiné les propriétés biochimiques des F.L., qui sont récoltées après lavage de la surface du milieu solide avec une solution saline. Mais une telle technique fournit de faibles quantités de microorganismes. D'autre part, la colonie L, en se développant, s'incruste dans la gélose par sa partie centrale, constituée essentiellement de formes naines et ces éléments sont difficilement récupérables. De ce fait, la culture sur gélose ne pouvait absolument pas convenir pour les expériences que nous nous proposions de réaliser. Il nous fallait adopter une technique de culture des F.L en milieu liquide.

Quand nous avons entrepris notre étude sur les F.L, divers auteurs (16, 1) avaient déjà cultivé avec succès ces organismes en milieu liquide ou en surface comme Tulasne et coll. (109). Mais les méthodes qui avaient été décrites nécessitaient un travail long et laborieux pour obtenir une quantité suffisante de microorganismes. La technique de culture des F.L que nous avons mise au point présente les avantages et la simplicité des ensemencements bactériens habituels.

A la même période où nous avons effectué nos recherches sur la constitution chimique et le métabolisme des F.L ou postérieurement à nos travaux, d'autres auteurs (40, 79, 119), ont entrepris des études

biochimiques sur ces microorganismes et les ont cultivés en suspension dans un milieu liquide. Cependant, le rendement que nous obtenons avec le bouillon hypertonique est en général très supérieur à celui de ces auteurs en dehors de Weibull et Beckman (119) qui ont des rendements du même ordre de grandeur que le nôtre. Ainsi Kandler et coll. (40) obtiennent environ 30 mg, Panos et coll. (79) 10 à 23 mg de substance sèche pour 100 ml de culture en phase stationnaire, alors que nos suspensions de F.L fournissent 50 à 60 mg en poids sec pour 120 ml de culture. Il est donc évident que grâce à son rendement la méthode de culture en suspension dans le milieu liquide hypertonique que nous préconisons offre de très grandes facilités pour des études biochimiques.

Nos cultures peuvent être aisément repiquées en bouillon hypertonique comme une suspension normale de bactéries. Par ailleurs, nous conservons facilement notre souche de F.L dans ce milieu en la repiquant régulièrement chaque semaine, alors que certaines autres méthodes nécessitent un passage régulier des F.L sur milieu solide.

LA MORPHOLOGIE DES F.L.

Nos cultures en suspension contiennent toujours des F.L de diverses tailles, 0,1 à 11,4 μ de diamètre. Ceci n'est pas le cas pour certaines autres cultures de F.L en milieu liquide, qui sont soit essentiellement constituées de formes granulaires (1, 23), soit de formes globuleuses grandes (2). Du point de vue morphologique, nos F.L en suspension diffèrent de celles obtenues par culture en surface (méthode de Tulasne) et sur gélose par l'absence de formes globuleuses géantes (11,5-24 μ). Nos cultures sont par contre semblables aux F.L étudiées par Panos et Barkulis (78), par Weibull et Beckman (119), constituées par des éléments dont le diamètre varie de 0,2 à 10 μ. D'autre part, les formes globuleuses grandes, avec phénomène de vacuolisation, qui apparaissent durant la phase stationnaire dans le procédé de Kandler et coll. (40) sont très rares dans nos cultures.

La numération du nombre relatif des diverses espèces morphologiques des F.L a permis de retrouver dans les cultures en milieu hypertonique, en dehors des formes géantes de 11,5 à 24 μ, tous les éléments qui constituent une colonie sur gélose ou un voile et à un taux voisin dans les trois types de culture.

En étudiant l'aspect morphologique de nos suspensions de F.L à divers stades de la croissance, nous avons montré que la taille moyenne des espèces morphologiques des F.L diminue au cours de l'évolution de ces microorganismes. Les cultures à la fin de la phase logarithmique et au début de la phase stationnaire contiennent un plus grand nombre de petites formes (1,0 à 4,4 μ de diamètre) que les cultures jeunes. En relation avec cette observation, il est intéressant de rappeler que la taille moyenne des cellules bactériennes

diminue au cours du cycle de croissance. Un tel fait a été également observé et signalé par Weibull et Beckman (119) dans leurs cultures de F.L. L'ensemble de ces résultats est en accord avec la conclusion de Tulasne et coll. (108) à savoir que les F.L du type A se reproduisent par division directe.

LA CINETIQUE DE LA CROISSANCE.

Elle a été étudiée en suivant l'évolution de la turbidité et du poids sec. Mais nous avons montré que la seule évaluation correcte permettant la comparaison des résultats était celle de la détermination du poids de substance sèche. La cinétique de la multiplication des F.L cultivées d'une part en voile, d'autre part en suspension dans le milieu hypertonique, a montré que cette dernière méthode de culture permet une prolifération plus rapide des F.L. Les F.L cultivées en suspension ont une vitesse de croissance qui se rapproche bien plus de celle de la bactérie normale que les cultures en surface et sur gélose. Il persiste cependant un certain décalage dans le temps, à savoir que la phase stationnaire est atteinte 24 heures plus tard dans la culture de F.L en suspension que dans la culture bactérienne. D'autre part, la croissance totale des F.L reste inférieure à celle du Proteus.

Postérieurement à notre travail, Weibull et Beckman (119), ont comparé la croissance d'une souche de Proteus vulgaris et de sa F.L cultivées dans le milieu liquide d'Abrams; ils ne constatent aucune différence significative entre leurs vitesses de croissance. Mais dans le milieu employé par ces auteurs la phase logarithmique des bactéries comme des F.L se situe entre 1 et 20 heures et la phase stationnaire n'est atteinte qu'au bout de 30 heures, ce qui est singulier pour la bactérie de l'espèce Proteus et signifie que ce milieu n'est pas favorable à cette dernière. Panos et Barkulis (78) trouvent que les F.L de Streptococcus atteignent la phase stationnaire au bout de 8 heures, se développant suivant le même rythme que les bactéries, mais leur rendement pour les F.L est très inférieur au nôtre. Par ailleurs les divergences peuvent s'expliquer par la nature de la souche microbienne. Elles révèlent cependant une grande variété dans le mode de croissance des F.L.

En fait, ce qui importe avant tout, c'est d'analyser les deux types de microorganismes à des stades d'évolution similaire si l'on désire effectuer une étude de la constitution ou du métabolisme. En tout état de cause, nous pouvons affirmer que les F.L cultivées en suspension dans le milieu hypertonique se multiplient rapidement, donnant naissance à une population hétérogène abondante.

B. — LE FRACTIONNEMENT DES FORMES L.

La méthode de fractionnement que nous avons mise au point nous a permis de séparer les diverses espèces morphologiques des

F.L. Jusqu'alors, des recherches biochimiques et métaboliques n'avaient été entreprises que sur les cultures entières des F.L. Or, pour étayer l'explication de la transformation L, il fallait étudier ces microorganismes constituant une population hétérogène, en considérant isolément les divers types présents dans les cultures. Cela, croyons-nous, est une condition essentielle pour mieux saisir l'activité métabolique et la signification des F.L.

Ainsi que nous l'avons montré, nous obtenons à l'aide de notre technique quatre fractions: une fraction I contenant les formes globuleuses grandes (4,5-11,4 μ), une fraction II qui renferme les éléments de taille moyenne (2,2-4,4 μ), une fraction III correspondant aux organismes petits (1,0-2,1 μ) et enfin la fraction IV qui contient les formes naines (0,1-0,9 μ). L'étude de la répartition des F.L de diverses tailles dans les fractions montre que la contamination d'une fraction par une autre est faible; ceci a pu être confirmé par les examens des diverses fractions aux microscopes optique et électronique. Ainsi les données concernant les constituants chimiques et les activités métaboliques des divers types morphologiques sont dans nos conditions significatives. Il est en effet aisé de savoir si les différences constatées entre deux types morphologiques sont réelles quand on connaît le degré de contamination et quand les erreurs qui en résultent sont manifestement inférieures aux différences observées.

Signalons que notre méthode de fractionnement a été utilisée avec succès par Weibull en 1960 afin d'obtenir des formes naines et d'en étudier le métabolisme.

En examinant la répartition des éléments de diverses tailles des F.L dans nos conditions de culture, on constate qu'environ 80 p. 100 du poids sec de ces éléments sont constitués par des organismes globuleux de 2,2 à 11,4 μ de diamètre. Les formes petites et naines ne représentent approximativement que 20 p. 100 du poids de la culture totale. C'est là une notion dont il y a lieu de tenir compte lorsque l'on analyse les résultats obtenus sur des cultures totales de F.L.

C. — LE POUVOIR DE PROLIFERATION DES DIVERSES FORMES MORPHOLOGIQUES.

L'étude de la prolifération des formes globuleuses isolées d'une culture de F.L par filtration avait montré que 1 à 50 éléments sur mille sont capables de donner naissance à une colonie L (17, 43, 53, 51). Par contre, récemment des corps globuleux isolés par micromanipulation à partir d'une colonie L stable sur milieu solide et réensemencés sur milieu semi-solide paraissent selon Roux (88) se comporter comme des bactéries normales où une cellule sur deux se divise. Mais on n'a pas observé de multiplication des formes granulaires infra-microscopiques obtenues par filtration (43) ou par micromanipulation (88).

Ayant été les premiers à pouvoir isoler sur une grande échelle

les divers types morphologiques des F.L d'une même suspension, nous avons facilement pu étudier parallèlement le pouvoir de prolifération des diverses formes. Le réensemencement en milieu liquide ou sur milieu solide des fractions I, II et III, isolées selon la méthode que nous avons décrite, fournit des cultures contenant toutes les espèces morphologiques des F.L depuis les grandes jusqu'aux naines. La courbe qui traduit la cinétique de la croissance des diverses fractions dans le milieu liquide comprend deux parties: l'une à pente faible, l'autre à pente plus forte. Si l'on considère à un même délai la partie des droites à pente faible, on note qu'après ensemencement en milieu liquide la prolifération de la fraction III est plus lente que celle des fractions I et II. Mais si l'on considère le rendement final au moment où s'effectue l'inflexion de la courbe, il est le même pour les trois fractions. Nous avons ensemencé des quantités différentes pour les diverses fractions, correspondant approximativement à leur taux dans une culture hétérogène, si bien que la quantité de départ était supérieure pour les fractions I et II par rapport à la fraction III. La différence des délais nécessaires pour obtenir le même accroissement pourrait peut être s'expliquer par les quantités de matériel biologique différentes au départ.

En passant du milieu liquide sur un milieu solide, comme on pouvait s'y attendre, la prolifération est beaucoup moins active pour toutes les fractions et surtout pour la fraction III. Ainsi nous avons obtenu pour les formes de la fraction I et II, organismes dont la taille varie entre 2,2 et 11,4 μ de diamètre, respectivement 19 et 12 colonies pour 1000 éléments sur bouillon gélosé et respectivement 68 et 56 colonies pour 1000 éléments sur un milieu synthétique. Ces valeurs sont de l'ordre de grandeur indiqué par certains des auteurs précités (17, 43, 53, 51). Par contre le taux des organismes de la fraction III (1,0 à 2,1 μ) susceptible de former des colonies apparaît très faible dans ces mêmes conditions expérimentales; il est suivant le milieu de culture utilisé 40 à 60 fois ou 14 à 17 fois inférieur à celui des autres fractions, au point de pouvoir être attribué à la contamination par les éléments de la fraction II. C'est pourquoi il nous a paru utile d'effectuer le contrôle en réensemençant par micromanipulation les formes de la 3e fraction sur un milieu semi-solide gélosé à 0,2 p. 100, qui permet encore l'obtention de colonies. Nous avons alors mis en évidence un taux de viabilité très élevé de ces petites F.L. Le rendement est presque de 100 p. 100 et serait par conséquent même supérieur à celui de 50 p. 100 signalé par Roux (88) pour les formes globuleuses grandes.

Compte tenu des faits observés dans le réensemencement en milieu liquide, les différences observées dans le pouvoir de prolifération des diverses fractions des F.L repiquées sur milieu solide peuvent être dues aux possibilités d'adaptation au passage immédiat du milieu liquide au milieu solide. Or on sait que le changement dans

la constitution et l'état physique d'un milieu de culture nécessite pour certaines souches bactériennes une telle adaptation. Il semble que ce soit le cas des F.L et que leur pouvoir de prolifération s'en ressente. Ceci nous paraît d'autant plus vraisemblable que les diverses fractions I, II et III réensemencées en bouillon hypertonique fournissent des cultures dont les accroissements évaluées par turbidimétrie sont voisins, la différence résidant dans la vitesse avec laquelle ceux-ci s'accomplissent.

Le rendement élevé de Roux (88) pour les formes globuleuses grandes, ainsi que le nôtre obtenu après micromanipulation des éléments petits peut s'expliquer par le fait que la sortie des F.L du milieu hypertonique et le réensemencement sur milieu solide en boîte de Petri les exposent à une certaine destruction du fait de leur extrême fragilité.

Les éléments granulaires de notre 4e fraction ne montrent que très rarement de signe de prolifération et la contamination par des formes plus grandes pourrait en être la cause. Par contre les éléments filtrables sur une bougie CHAMBERLAND 3L3 ne donnent de prolifération ni dans notre milieu hypertonique, ni sur milieu solide. Ces résultats ont été confirmés récemment par Weibull et Beckman (121) et par Weibull et Lundin (122), pour qui les formes dont le diamètre est inférieur à 0,6 μ sont incapables de se multiplier.

Mais devant la possibilité d'une multiplication des éléments granulaires, il convient d'admettre que leur prolifération nécessite des cofacteurs particuliers, qu'ils ne peuvent vraisemblablement plus synthétiser. La présence d'un A.D.N. dans ces formes représente une condition nécessaire mais qui peut ne pas être suffisante pour la prolifération.

II. CONSTITUTION CHIMIQUE DES FORMES L.

LES LIPIDES.

La détermination de la quantité de lipides par unité de poids sec dans les cultures entières de F.L en phase stationnaire indique que ces organismes en contiennent plus que la bactérie normale; le rapport est du simple au double environ (tableau 11). La différence est pourtant bien moins accusée que celle signalée antérieurement par Vendrely et Tulasne (111). Ces auteurs ont trouvé pour le Proteus un taux de lipides rapporté au poids sec de 6,0 p. 100 et pour les F.L de 24,3 p. 100. On peut se demander si les valeurs très fortes constatées par ces auteurs n'étaient pas dues au fait que leurs cultures en voile étaient âgées de 3 à 4 semaines.

En ce qui concerne la teneur en phosphore lipidique, si l'on rapporte les valeurs à 1 mg de lipides, il n'y a pas de différence entre les deux types de microorganismes. Il semble donc que la pro-

portion relative de l'ensemble des phosphatides au sein de la masse des lipides reste inchangée. Mais en calculant le quotient P lipidique sur N protéique, nous trouvons pour les F.L des valeurs supérieures à celles des bactéries, comme KANDLER et coll. (40) dans des conditions de culture différentes. En somme si l'on trouve dans les F.L en phase stationnaire une quantité de P lipidique par mg de protéines supérieure à celle des bactéries, les valeurs des lipides sont également plus fortes dans les mêmes proportions.

D'autre part, nous avons examiné les variations du taux des lipides dans le bacille Proteus et les F.L au cours de la croissance. Ce taux augmente légèrement dans les microorganismes au début de leur développement par la suite il reste relativement constant. A chaque délai examiné la teneur en lipides des F.L est régulièrement 2 à 3 fois supérieure à celle du bacille. WEIBULL et BECKMAN (119) trouvent dans les F.L des quantités de lipides inférieures à celles des bactéries. Mais il n'est pas douteux que, pour les lipides en particulier, des différences importantes peuvent se manifester selon le milieu de culture. Le sérum présent dans notre milieu, de même que dans celui de KANDLER et coll., mais absent dans celui de WEIBULL et BECKMAN joue très vraisemblablement un rôle important. Notons que tous les auteurs, en dehors de WEIBULL et BECKMAN, ayant travaillé au début de la phase stationnaire, ont mis en évidence un taux de lipides et de phosphatides nettement supérieur dans les F.L. Le vieillissement des cultures paraît favoriser cette différence.

Si l'on rappelle qu'en fait la teneur en lipides exprime le rapport entre l'intensité de synthèse de ces derniers et des protéines, on peut être conduit à affirmer que la biosynthèse des composés lipidiques est plus active dans les F.L. En réalité, il pourrait s'agir simplement d'une réduction du rythme des synthèses protéiques. On en arrive ainsi à la conclusion que le mieux serait d'évaluer la quantité de lipides pour chaque type morphologique, voire par élément microbien.

Nous avons évalué le taux de lipides des diverses espèces morphologiques des F.L. Alors que les formes globuleuses moyennes (fraction II) ont une teneur en lipides similaire à celle de la culture totale et les organismes grands (fraction I) une teneur plus faible, les formes petites ,(fraction III) et naines (fraction IV) se distinguent nettement de l'ensemble des F.L.: les premières possèdent un taux très élevé, les secondes un taux extrêmement faible en lipides qui est même inférieur à celui de la bactérie. Les différences ne pourraient d'aucune façon s'expliquer par une contamination d'une fraction par une autre. Les formes naines ressembleraient aux PPLO qui contiennent également peu de lipides (40, 60). Rappelons que certaines similitudes entre PPLO et formes naines ont soulevé de nombreuses discussions (17, 106, 48, 37).

En rapportant la quantité de lipides à un élément microbien, on trouve pour le bacille $0{,}045 \times 10^{-9}$, pour les formes globuleuses

grandes (fraction I) 0,92 $\times$ 10^{-9}, pour les organismes de taille moyenne (fraction II) 0,13 $\times$ 10^{-9} et pour les éléments petits (fraction III) 0,21 $\times$ 10^{-9} mg de lipides. Ces résultats établissent d'une façon définitive que dans nos conditions expérimentales les diverses formes morphologiques des F.L, à l'exception des formes naines, sont plus riches en lipides que les bactéries dont elles proviennent. Si nous n'avons pas pu évaluer la quantité de lipides par élément de formes naines, il est cependant évident qu'elle est plus faible que dans la bactérie, compte tenu de la teneur en lipides évaluée par rapport aux protéines et la quantité très faible de ces protéines par élément nain.

LES PROTEIDES.

La valeur moyenne du taux des protéides rapporté au poids sec, est légèrement plus faible dans les cultures de F.L que pour le bacille aux diverses périodes du développement, ainsi qu'en phase stationnaire. Cependant, les différences ne sont pas significatives. Si l'on envisage les diverses phases de la croissance, on peut noter pour le Proteus des valeurs nettement plus faibles. durant les premières deux heures par rapport aux chiffres trouvés depuis la sixième jusqu'à la vingt-quatrième heure. Pour les F.L une différence significative ($p < 0,05$) peut être notée entre les cultures de 4, 9 et 39 heures. L'ensemble de ces faits offre un aspect du ralentissement des biosynthèses protéiques dans les F.L. Le retard finit cependant par être rattrapé et la valeur moyenne de la période de 6 heures des bactéries se situe dans la même zone que celle de 39 heures pour les F.L.

En accord avec nos résultats, Panos et coll. (79) mettent en évidence un taux identique en N protéique dans les deux types de microorganismes en phase stationnaire. Cependant, Vendrely et Tulasne (111) trouvent pour les F.L une teneur en protéines bien inférieure à celle de la bactérie. Les valeurs rapportées au poids sec sont respectivement pour ces deux types de microorganismes de 58,9 p. 100 et de 73 p. 100. Ce taux très faible dans les F.L serait dû à ce que les cultures étaient très âgées (3 à 4 semaines) et très riches en lipides. Notons que Kandler et coll. (40), Medill-Brown et coll. (68) trouvent que les bactéries sont plus riches en protéines que les F.L. Mais ceci s'expliquerait fort bien par le fait d'une croissance plus lente des F.L dans les milieux employés par ces auteurs, qui amplifie les différences durant une période plus longue. Les mêmes raisons peuvent être invoquées pour expliquer les constatations de Jungerman et Pogonowska (34) qui comparent deux souches de Salmonella et leurs F.L à un certain délai fixe du développement et trouvent tantôt une baisse faible, tantôt une baisse forte des protéines de ces F.L. Enfin, Weibull et Beckman (119) tout récemment enregistrent un taux de protéines plus élevé dans les F.L que dans les bactéries. Ceci est en

fait le reflet d'un taux de lipides plus faible dans les F.L cultivées dans le milieu de ces derniers auteurs.

Ainsi ces divergences s'expliquent soit par la nature de la souche microbienne, soit par les milieux de culture très différents dans les divers cas et qui seraient susceptibles d'influencer notablement l'intensité des synthèses protéiques. Il importe de signaler que le seul auteur qui trouve des valeurs de protéines plus élevées dans les F.L que dans la bactérie opère dans un milieu ne contenant pas de sérum. Mais il convient également de se demander si la prédominance de l'une ou de l'autre forme n'est pas à l'origine des différences entre les divers résultats des auteurs précités.

L'existence de populations hétérogènes dans les cultures de F.L appelait de toute évidence une analyse individuelle des protéides de chaque espèce morphologique. Nous avons constaté dans les formes globuleuses des fractions I et II une teneur moyenne en protéides légèrement supérieure à celle des cultures entières de F.L et des bactéries. Les différences ne sont cependant pas significatives en raison de la dispersion des résultats expérimentaux. A l'opposé, les formes naines (fraction IV) ont un taux de protéides plus faible que les F.L de grande et moyenne tailles et que les bactéries, alors que les éléments petits (fraction III) sont très pauvres en protéides. Nos constatations sont en accord avec celles de Weibull et Beckman (121), postérieures aux nôtres et avec les observations de Lynn et Smith (60) sur les PPLO, ces organismes contenant une quantité faible de protéines. On peut se demander, si dans le cas de la fraction III, la baisse du taux des protéides se fait uniquement au dépend des protéides de constitution, laissant intacte les molécules jouant un rôle métabolique, tels les enzymes. Chez les formes naines la biosynthèse des enzymes elle-même pourrait être touchée.

Il était intéressant de calculer les valeurs des protéides par élément microbien. On trouve dans ce cas pour le Proteus $0{,}43 \times 10^{-9}$, pour les formes de la fraction I $14{,}4 \times 10^{-9}$, pour celles de la fraction II $0{,}62 \times 10^{-9}$ et pour les organismes petits de la fraction III $0{,}32 \times 10^{-9}$ mg de protéides. Un autre mode de présentation des résultats nous semblait également indiqué, à savoir le quotient µg de protéides sur µg de P-A.D.N. Dans ce cas, on note des valeurs plus faibles dans la culture entière des F.L. (194 µg protéides par µg de P-A.D.N.), la fraction I (192 µg) et la fraction II (206 µg), que pour le Proteus (252 µg). A l'opposé, le quotient, beaucoup plus élevé pour les fractions III et IV, est respectivement de 1.400 et 1.640.

Aussi, quel que soit le mode de présentation ou d'analyse des valeurs expérimentales, on peut en déduire que la transformation de la bactérie en F.L s'accompagne d'une perturbation de la régulation des synthèses protéiques.

En faisant un bilan des protéides et des lipides, nous trouvons dans 100 mg de poids sec un total de 73,7 pour le Proteus, de 82,5

pour les F.L entières, de 77,3 pour la fraction I, de 83,2 pour la fraction II, de 87 pour la fraction III et de 63,8 pour la fraction IV. Là encore, il s'agit de données relatives qui nous indiquent que 26,3 p. 100 de la matière sèche du Proteus est constituée par des substances autres que les protéides et les lipides; les glucides, en particulier les mucopolysaccharides, doivent en constituer la majeure fraction à côté des éléments minéraux et des composés acido-solubles, tels les acides aminés, les peptides, les acides organiques, les nucléotides libres et autres esters phosphoriques. Cette fraction de composés, qui se situe à côté des protéides et des lipides, est plus faible dans la culture entière des F.L et dans les formes morphologiques des fractions I, II et III que dans le bacille. Son importance quantitative varie en fonction de la place qu'occupent les lipides qui se substituent aux constituants de la paroi bactérienne, existant généralement à un taux très faible dans les F.L. Il reste par contre à élucider la nature des 36,2 p. 100 de la matière sèche de la fraction IV. Mais cette étude est rendue difficile du fait que cette fraction ne représente qu'une faible part des F.L et qu'il aurait fallu des cultures à une grande échelle pour permettre des identifications non équivoques.

LES ACIDES NUCLEIQUES.

On sait que l'A.R.N. intervient dans la biosynthèse des protéines et que vraisemblablement la structure des protéines est déterminée par la séquence des nucléotides dans une molécule d'A.D.N. vecteur des informations génétiques. Il était par conséquent d'un grand intérêt d'étudier ces deux acides nucléiques du point de vue quantitatif et qualitatif.

Etude quantitative.

Nous avons rapporté les teneurs en A.N. aux protéides, car ces dernières représentent en gros la masse active. L'introduction comme base de référence du poids sec tient compte du taux des lipides qui d'après certains résultats préliminaires dont nous disposons paraissent s'accumuler comme une simple réserve. En phase stationnaire, nous avons trouvé une valeur moyenne d'A.R.N. plus élevée dans l'ensemble des F.L par rapport à la bactérie normale; la différence n'est pourtant pas significative (p: 0,05-0,10). Il existe par contre une augmentation de l'A.D.N. ($p < 0,01$) qui est assez importante. Cependant en raison de la dispersion des valeurs, les rapports P-A.R.N./P-A.D.N., qui expriment le taux d'A.R.N. à l'échelle cellulaire et qui sont respectivement pour la bactérie et les F.L entières de $3,00 \pm 0,40$ et de $2,83 \pm 0,37$, ne sont pas significativement différents.

Nos résultats se distinguent de ceux de Vendrely et Tulasne (111) qui ont trouvé pour les cultures de F.L un rapport A.R.N./A.D.N. de 0,14, donc extrêmement faible par rapport à celui du Proteus qui était de 2,5. Ceci résulte du fait qu'ils trouvent une teneur nettement

plus élevée en A.D.N. (1,45 pour 100 parties de matière sèche) et beaucoup plus faible pour l'A.R.N. (0,20 pour 100). Là encore les écarts sont dus au fait que ces auteurs ont travaillé sur des cultures de F.L très âgées. En accord avec nous et postérieurement à nos constatations. Panos et coll. (79), Medill-Brown et coll. (68) ne notent pas de différence significative entre la bactérie et les F.L en ce qui concerne le rapport A.R.N./A.D.N.

L'étude des A.N. au cours des diverses phases de la croissance apporte des renseignements précieux. Dans les bactéries et les F.L l'A.R.N. est rapidement synthétisé pendant la phase de latence et le début de la phase logarithmique, précédant la période de synthèse active des protéides. Les valeurs maxima sont atteintes au début de la phase exponentielle, ensuite la teneur en A.R.N. décroît. Les valeurs du P-A.R.N. rapportées aux protéides dans le Proteus sont supérieures à celles des F.L pendant les premiers stades de la croissance; mais si l'on considère les chiffres maxima des deux types de microorganismes la différence est à peine de 8 p. 100. Cependant, au début de la phase stationnaire, les valeurs sont similaires et pour les périodes ultérieures, le taux d'A.R.N. du bacille devient inférieur à celui des F.L. Mais dans aucun cas, il n'y a de différences significatives. En somme, comme l'indiquent les courbes le phénomène dominant est un décalage dans le taux de l'accroissement des A.R.N., ce qui explique les différences dans le rythme de prolifération du bacille et des F.L. Le quotient P-A.D.N. sur protéides s'accroît notablement au début de la phase logarithmique, puis reste constant durant la croissance. La teneur en P-A.D.N. est environ 39 p. 100 plus élevée dans les F.L que dans les bactéries pendant toute la période de développement étudiée. Enfin, la valeur moyenne du rapport P-A.R.N./P-A.D.N. est toujours plus élevé pour le Proteus; l'écart est à son maximum pendant la période de croissance exponentielle, c'est-à-dire au moment où les synthèses sont au maximum, il est alors d'environ 85 p. 100 supérieur dans la bactérie; cet écart diminue ensuite durant la phase stationnaire et cesse d'être significatif.

Si nous exprimons le P-A.R.N. et le P-A.D.N. en fonction du poids sec, nous observons les mêmes variations en fonction de la croissance des microorganismes. En tout état de cause pour la bactérie, ainsi que pour la F.L, les cultures jeunes se caractérisent par une teneur élevée en acides nucléiques.

Nos résultats sont en accord avec les constatations de nombreux auteurs (62, 5, 55, 75, 73, 115, 125, 99, 15). Déjà en 1947, Malmgren et Heden (62) ont trouvé que la teneur des substances absorbant dans l'ultraviolet de diverses bactéries augmente dans les premières heures de la croissance, pour décroître par la suite. Ces fluctuations sont dues essentiellement à la variation de la teneur en A.R.N., le taux d'A.D.N. restant approximativement constant au cours de la croissance bactérienne. D'autre part, Kandler et coll. (40), Weibull et

Beckman (119), qui ont étudié, à la même période ou postérieurement à nous, les A.N. au cours du développement d'une souche bactérienne et de la F.L qui en dérive retrouvent en gros les mêmes types de variations. Si Kandler et coll. observent comme nous que la F.L est pendant tout le cycle de croissance de 25 p. 100 plus riche en A.D.N. que la bactérie, la teneur en A.R.N. des F.L, dans leurs essais, reste toujours inférieure de 50 p. 100 de celle du bacille. De là un écart considérable du rapport A.R.N./A.D.N. entre les deux types de microorganismes. Par contre Weibull et Beckman confirment nos résultats concernant l'A.R.N., mais ne trouvent aucune différence pour l'A.D.N.

Il y a lieu de rechercher la cause de cette divergence des résultats dans les conditions expérimentales et les méthodes analytiques qui ne sont pas toujours identiques. Il faut signaler que les cultures de Kandler et coll. contiennent de nombreuses formes à vacuoles, ce que peut expliquer le faible taux en A.R.N. trouvé par ces auteurs. Le fait que nos valeurs d'A.R.N. sont plus élevées témoigne de conditions de culture plus favorables.

En somme, il ressort de l'ensemble des résultats que dans les bactéries et les F.L, l'aptitude à la synthèse la plus élevée se manifeste durant la phase logarithmique. Si pour un même délai les différences peuvent être très importantes, il n'en est plus de même quand on tient compte de la cinétique d'évolution de chacun des microorganismes. Quand le niveau de synthèse baisse, la différence entre les teneurs en A.N. de la bactérie et la F.L tend à diminuer.

En comparant les résultats concernant les F.L entières et les éléments des fractions I et II d'une part à ceux de la bactérie d'autre part, il en ressort un fait fondamental: alors que l'A.R.N. accuse des valeurs voisines, la teneur en A.D.N. est beaucoup plus élevée dans les F.L considérées. Ceci rappelle le fait signalé par de nombreux auteurs, que la transformation de la bactérie en forme globuleuse entraîne une augmentation du taux d'A.D.N. Ainsi Rippel-Baldes et coll. (85), Nermut et Drasil (77), Petras (82) mettent en évidence que la transformation de la bactérie en forme d'involution s'accompagne d'une augmentation de la teneur en A.D.N. Mais l'existence de similitudes entre les formes d'involution qui ne prolifèrent pas et les F.L reste à démontrer. En tout cas l'accroissement de la teneur en A.D.N. indique un ralentissement des synthèses protéiques par rapport à celles des A.N.

Pour ce qui est des fractions III et IV, qui renferment les formes petites et naines, leurs teneurs en A.N. s'écartent nettement de celles des autres fractions, ainsi que des bactéries. Il semble bien que la fraction III qui diffère déjà du bacille et des autres espèces morphologiques de F.L par son taux de lipides et de protéides, sa teneur très élevée en A.R.N. et très faible en A.D.N. contient les éléments qui se

distinguent le plus de la bactérie normale. Les organismes petits, qui appartiennent à la fraction III, possèdent un rapport P-A.R.N./P-A.D.N. très élevé (de 21,4). Les formes naines contiennent à la fois peu d'A.R.N. et peu d'A.D.N. Ceux qui traversent le filtre CHAMBERLAND 3L3 ne contiennent plus que 285 µg de P-A.R.N. pour 100 mg de protéides contre 1.190 µg dans la bactérie. Cependant, le taux d'A.D.N. est similaire à celui du Proteus. Ces formes naines se rapprochent donc également pour ce qui concerne leur A.N. des PPLO. On s'explique dès lors que certains auteurs considèrent les PPLO comme des F.L stables issues de bactéries inconnues (17, 106). Il faut cependant noter que le rapport P-A.R.N./P-A.D.N. pour nos formes filtrables se situe en dessous de l'unité (0,73), ce qui n'est jamais le cas pour les PPLO. On peut également se demander si ces F.L filtrables, qui contiennent une teneur en A.D.N. relativement importante ne seraient pas des formes intermédiaires entre les bactéries et les plus gros virus?

Comme pour les autres constituants, nous avons évalué la quantité totale d'A.R.N. par élément bactérien ou F.L. Il est alors apparu que les fractions I, II et III contiennent toujours nettement plus d'A.R.N. qu'une bactérie. Si les valeurs d'A.R.N. atteignent au maximum le double quand on examine les fractions II et III, les grands éléments de la fraction I possèdent en moyenne 50 fois plus d'A.R.N. qu'un Proteus. Il convient de souligner que les F.L de la fraction III, tout en contenant en moyenne plus d'A.R.N. que les bactéries, possèdent moins de protéides. Ceci reflète une perturbation métabolique singulière qu'il conviendrait d'analyser, compte tenu de la fonction biologique de l'A.R.N.

Quand on considère les quantités d'A.D.N. d'un noyau bactérien et d'un élément des fractions I et II des F.L, les formes globuleuses de la fraction II contiennent 2,7 fois plus d'A.D.N. qu'un noyau bactérien, les organismes de la fraction I ont une teneur beaucoup plus élevée, jusqu'à 112 fois plus. Les excès en A.D.N. par élément indiquent un défaut dans la division cellulaire, qui normalement tend à maintenir la quantité d'A.D.N. caractéristique de l'espèce. Il paraîtrait donc, compte tenu de ces dosages chimiques, que les grandes formes globuleuses soient des éléments polyploïdes ou multinuclées. Les observations cytologiques de Tulasne (105), de Schellenberg (89) et de Nermut (76) parlent en faveur de cette dernière hypothèse, puisque ces auteurs ont trouvé des formations qu'ils appellent «nucléoïdes» en grand nombre dans les formes globuleuses. Si l'on rappelle que la quantité d'A.R.N. de ces éléments globuleux était également 50 fois plus élevée que celle des bactéries, on est conduit à considérer ces formes morphologiques comme un genre de syncytium.

En opposition avec les formes grandes, les éléments petits de la fraction III que nous avons examinés plus particulièrement, ne contiennent que la moitié d'A.D.N. d'un noyau bactérien de Proteus en

phase stationnaire. Comme ce dernier est déjà haploïde, il convient d'admettre que les F.L de la fraction III ne contiennent que la moitié de la quantité d'A.D.N. d'un élément bactérien haploïde. Or nous avons vu par ailleurs avec les F.L réversibles que les éléments de la troisième fraction sont susceptibles de redonner des bactéries normales. Ceci pose le problème de la reconstitution d'une bactérie à partir d'une quantité d'A.D.N. qui est égale à la moitié de la quantité d'A.D.N. de la bactérie haploïde.

On pourrait également se demander s'il n'existe pas dans les petites formes L un A.D.N. à simple hélice («single stranded»), tel que celui qui a été signalé par Sinsheimer (94, 95) dans le phage Φ X 174 et par Kay (41) dans la phage Φ R. Il serait pas conséquent intéressant d'isoler l'A.D.N. des petites formes de la fraction III et de le soumettre à l'analyse physico-chimique. Ce travail que nous nous proposons d'entreprendre et que nous avons d'ailleurs déjà tenté, se heurte à la difficulté d'isoler à partir de la fraction la moins abondante dans une culture de F.L, un A.D.N. parfaitement dépourvu de protéines en quantités suffisantes pour les mesures physiques.

Signalons encore que notre observation se rapproche des résultats de Hodson et Beck (29) qui montrent que les spores contiennent un peu moins que la moitié du P-A.D.N. des cellules végétatives et de ceux de Petras (82) sur les formes coccoïdes de bactéries obtenues par action de divers agents nocifs et qui ne renferment qu'une certaine fraction de l'A.D.N. bactérien.

Etude qualitative.

L'étude de la composition globale de l'A.R.N. du bacille Proteus et des F.L totales n'a montré aucune différence entre ces deux types de microorganismes. La répartition des ribonucléotides de l'A.R.N. du bacille et des F.L totales obtenue après de nombreuses chromatographies donne un rapport 6-amino/6-céto (rapport des bases ayant un groupement amine en 6 aux bases ayant un groupement carbonyle en 6) qui est dans les deux cas de 0,92. En reprenant à titre de contrôle la même étude par la méthode électrophorétique nous avons trouvé un rapport de 0,88 pour le Proteus et de 0,97 pour les F.L. Cependant, quelle que soit la méthode considérée, il n'existe pas de différences significatives entre la bactérie et les F.L. Les valeurs sont assez proches de l'unité comme celles réunies par les autres auteurs (21, 80, 57, 98, 116, 60, 32, 100, 7).

En ce qui concerne les divers types morphologiques des F.L, les fractions I, II et III contiennent des A.R.N. d'une constitution globale similaire, identique à celle du bacille et des F.L entières. On est ainsi frappé par la discordance entre les différences quantitatives des teneurs en A.R.N. et l'aspect qualitatif de cet A.R.N. dans les diverses formes morphologiques des F.L. Le rapport 6-amino/6-céto

est de 0,94 pour la fraction I, de 0,98 pour la fraction II et de 0,97 pour la fraction III. Dans la fraction IV (formes naines), ce rapport est légèrement plus faible (0,82) et nous avons trouvé pour ces éléments une légère perturbation dans la répartition des ribonucléotides qui se traduit par une augmentation du GMP et une diminution de l'AMP. Notons que Lynn et Smith en 1957 (60) ont trouvé pour les P.P.L.O. une répartition des nucléotides de l'A.R.N. différente de celle des autres microorganismes, à savoir une forte teneur en CMP et un taux faible d'AMP. Nous avons déjà signalé antérieurement des similitudes entre les P.P.L.O. et les F.L naines.

La répartition très voisine des ribonucléotides du bacille Proteus et de sa F.L n'exclut évidemment pas des différences possibles dans les séquences et dans la composition des différents A.R.N. Mais l'analyse des séquences exige l'isolement des diverses fractions d'A.R.N., dont on connaît actuellement le grand nombre au sein de la cellule. De plus, il faudrait s'assurer que les fractions homogènes obtenues, n'ont pas été affectées par le mode de fractionnement. L'étude globale de la répartition des divers nucléotides garde son intérêt quand on trouve des différences. C'est dans cet espoir que nous avons entrepris cette étude.

La répartition des ribonucléotides des F.L cultivées en voile, selon la méthode de Tulasne et de celles cultivées en suspension dans le milieu hypertonique ne présente aucune différence. Cette constatation est en accord avec les observations faites par la plupart des auteurs sur d'autres microorganismes et selon lesquels le milieu de culture n'influencerait pas la composition de l'A.R.N. (57).

En ce qui concerne l'A.D.N. nous n'avons trouvé aucune différence significative entre la bactérie et les F.L, quant à la répartition des bases puriques et pyrimidiques. Le rapport des bases puriques aux bases pyrimidiques (Pu/Py) est égal à 0,95 pour le Proteus et à 0,92 pour les F.L. Le rapport des bases ayant un groupement amine en 6 aux bases ayant un groupement carbonyle en 6 (6-amino/6-céto) est de 1,00 pour le bacille et de 1,02 pour la F.L. Compte tenu de l'erreur standard, ces valeurs sont très proches de l'unité, en accord avec les travaux de Chargaff (12) et conforme à la théorie de Watson et Crick (117). D'autre part, le rapport A + T/G + C étant respectivement de 1,50 et de 1,55 pour la bactérie et les F.L, nos microorganismes se placent dans le groupe désigné par Chargaff (12) comme «type AT» dans lequel l'adénine et la thymine prédominent.

Signalons que Spirin et coll. (97) notent une perturbation de la répartition des bases de l'A.D.N. chez des formes atypiques de bactéries obtenues dans des conditions de culture défavorables.

Cependant d'autres auteurs (20, 33, 6) ne constatent pas de telles différences. En tout état de cause les F.L capables de proliférer activement sur milieu solide pour donner naissance à des colonies ne

sont certainement pas comparables aux formes atypiques. Elles doivent plutôt être rapprochées des mutants bactériens, bien que la répartition globale en bases azotées de l'A.D.N. et de l'A.R.N. ne manifeste aucune altération apparente lors de la transformation de la bactérie en F.L. On sait, en effet, que de faibles différences dans la composition de l'A.R.N. et de l'A.D.N. ne sont pas décelables par nos méthodes de détermination. Ainsi les similitudes des structure de l'A.D.N. et de l'A.R.N. n'excluent pas que les F.L stables constituent une mutation, comme cela a été avancé par certains auteurs (58, 8).

Il aurait été intéressant d'étudier la composition de l'A.D.N. des divers types morphologiques des F.L. Mais la méthode de chromatographie que nous avons utilisée nécessite une quantité de matériel assez importante et nous nous proposons de poursuivre cette étude dans l'avenir.

III. RENOUVELLEMENT DES ACIDES NUCLEIQUES ET DE LEURS PRÉCURSEURS.

Ainsi que certains auteurs l'ont signalé, les protéines et les acides nucléiques paraissent métaboliquement stables pendant la croissance, le renouvellement ne peut être observé que dans les micro-organismes en phase stationnaire. C'est la raison pour laquelle nous avons étudié l'incorporation de phosphore radio-actif dans le Proteus et les F.L en phase stationnaire. Il est apparu que les A.S. (activité spécifique) de l'A.R.N. du bacille sont 1,5 à 2,5 fois plus élevées que celles des divers types morphologiques des F.L étudiées (formes grandes et moyennes, fraction I + II; formes petites, fraction III). Pour ce qui est de l'A.D.N., les A.S. sont 1,5 à 4 fois supérieures dans le bacille par raport à la fraction I + II des F.L. Par contre, les formes petites (fraction III) qui ont une teneur faible en A.D.N. se caractérisent par une A.S. élevée de cet A.N. Il en résulte que le renouvellement de l'A.D.N. est plus important que celui de l'A.R.N. dans ces formes.

Nous avons également vu que durant la phase stationnaire, les A.S. relatives (A.S. des A.N. rapportées aux A.S. des nucléotides) sont 7 à 12 fois supérieures pour l'A.R.N. de la bactérie. En ce qui concerne l'A.D.N., on trouve des valeurs 10 fois plus élevées dans le Proteus que dans la fraction I + II des F.L et 2,5 à 3,5 fois supérieures par rapport à la fraction III.

Si l'on tient compte de l'état final qui représente la résultante de la somme des incorporations du ^{32}P dans les nucléotides et de ces derniers dans les A.N., on trouve, à l'exclusion de l'A.D.N. de la fraction III, des valeurs d'activité spécifique plus fortes dans la forme bactérienne. Cependant à des délais d'incubation plus longs, l'incorporation finale du ^{32}P dans l'A.D.N. est également plus élevée dans les

bactéries que dans la troisième fraction. A des délais relativement courts l'activité spécifique plus forte de l'A.D.N. de la fraction III pourrait être mise en relation avec la perméabilité plus grande de ces F.L. à l'élément radio-actif en rapport avec l'absence de la paroi.

Si l'on envisage la décroissance de la radio-activité des A.N. d'une culture en phase stationnaire, incubée pendant la croissance microbienne en présence de ^{32}P et remise en milieu dilué enrichi en ions phosphates, mais dépourvu d'élément radio-actif, on saisit un autre aspect du renouvellement des A.N. La décroissance des premières deux heures est évidemment seule significative, car pendant les heures qui suivent la réincorporation du ^{32}P libéré intervient dans une mesure importante. Ainsi en considérant cette vitesse initiale de décroissance, le taux de renouvellement pendant les premières deux heures apparaît être pour le Proteus de 7,4 p. 100 dans le cas de l'A.R.N. et de 7,3 p. 100 dans celui de l'A.D.N., alors que dans les F.L on trouve 2,2 p. 100 pour l'A.R.N. et 4,0 p. 100 pour l'A.D.N. Nous avons donc là une nouvelle preuve d'une différence dans l'état dynamique des acides nucléiques des bactéries et des F.L.

L'ensemble de ces résultats nous mène à la conclusion que l'intensité du renouvellement des A.N. est plus forte dans la bactérie normale que dans les diverses fractions des F.L.

IV. MÉTABOLISME DES FORMES L.

Les études métaboliques du Proteus P18, des F.L totales et des divers types morphologiques de ces dernières nous ont montré des différences importantes.

CONSOMMATION D'OXYGENE.

Rapportée aux protéides, la consommation d'oxygène du Proteus est environ 6,5 fois plus élevée que celle des F.L totales. Quand on exprime les valeurs par rapport à l'A.D.N. la consommation d'oxygène est 8 fois plus élevée dans le bacille. Les F.L consomment donc moins d'oxygène que la bactérie normale. Nos résultats sont en accord avec ceux de Mandel et Terranova (63) concernant le Proteus Ahmed et les F.L stables cultivées en voile et avec ceux de Kandler et coll. (40) sur le Proteus vulgaris et une F.L qui en dérive.

Il était évidemment intéressant d'examiner la consommation d'oxygène des diverses espèces morphologiques des F.L, ce qui n'a pas été fait jusqu'à présent. Il s'est avéré que les petites formes (fraction III) fournissent les chiffres les plus élevés; ces derniers sont même supérieurs à ceux des bactéries normales si l'on rapporte les valeurs à l'A.D.N. Les organismes grands et moyens (fractions I et II) consomment respectivement 13 et 8,4 fois moins d'oxygène que la fraction III lorsque les valeurs sont rapportées à l'A.D.N.

Les éléments nains (fraction IV) présentent des quantités indosables, de consommation d'oxygène.

Ainsi les formes petites possèdent la respiration la plus intense, parallèlement à une valeur élevée du quotient A.R.N./A.D.N., comme nous l'avons vu plus haut.

Tout récemment, Weibull et Beckman (120), appliquant notre méthode de fractionnement, trouvent une respiration appréciable des formes naines. Mais leurs mesures de consommation d'oxygène ont été effectuées dans le milieu de culture. On imagine aisément que dans un tel milieu riche en substrats d'oxydation une contamination par des formes de la fraction III se manifeste plus aisément, donnant l'impression d'une respiration propre des formes naines. Il paraît d'ailleurs difficile d'accepter l'existence d'une respiration intense des éléments nains, dont les teneurs en A.R.N. et en protéides, donc en masse active, sont très faibles.

Il ressort de nos résultats concernant la consommation d'oxygène que la transformation du bacille en F.L entraîne une perturbation du métabolisme énergétique. De plus les éléments petits et les formes naines diffèrent des autres types morphologiques des F.L, les premiers par une respiration intense, les seconds au contraire par une consommation d'oxygène quasiment nulle. Les éléments petits constituant la fraction III représenteraient une forme métaboliquement très active. D'autre part, dans l'hypothèse qu'il existe une possibilité de passage des bactéries aux virus avec les F.L comme stade intermédiaire, les formes naines ayant perdu des enzymes de l'oxydation aérobie présenteraient une étape dans le processus de perte progressive d'équipement enzymatique.

ACTIVITES ENZYMATIQUES.

L'analyse des activités enzymatiques isolées nous a montré une diminution de l'activité aldolasique dans les F.L totales par rapport aux bactéries normales. Dans ce cas, les éléments petits (fraction III) présentent aussi une activité plus grande que celle des autres organismes globuleux; exprimée par rapport à l'A.D.N. leur activité aldolasique dépasse même celle du Proteus. Les formes naines sont toujours les moins actives; les corps globuleux grands et moyens ont une activité aldolasique intermédiaire, relativement faible (les valeurs rapportées à l'A.D.N. sont respectivement pour les fractions I et II 18 et 22,6 fois inférieures à la valeur de l'activité aldolasique de la fraction III).

En présence de succinate, de fumarate et de lactate, les activités déshydrogénasiques sont plus fortes dans le bacille que dans les F.L totales. Pour ce qui est de l'activité déshydrogénasique en présence de pyruvate, elle est plus faible dans la bactérie. C'est là une particularité qui mériterait d'être approfondie.

Quand nous parlons d'activités déshydrogénasiques en présence de divers substrats nous sous-entendons, comme nous l'avons déjà indiqué, le cycle des réactions des déshydrogénations qui se succèdent à partir de ces substrats. Nous avons employé provisoirement une méthode qui fournit un résultat global. Cette technique est suffisante, compte tenu de notre objectif qui était de mettre en évidence des différences métaboliques. Nous nous sommes proposé d'étudier les diverses activités enzymatiques en nous limitant chaque fois à une réaction précise. Mais cela pose encore des problèmes de mise au point technique et représente une étape future dans l'évolution de nos recherches.

En ce qui concerne les diverses fractions des F.L, l'activité déshydrogénasique est pour tous les substrats la plus élevée dans les éléments petits (fraction III). Les valeurs fournies par la fraction I, nettement inférieures à celles de la fraction III, sont supérieures à celles de la fraction II sauf, dans le cas des activités déshydrogénasiques en présence de fumarate. Notons que la fraction IV manifeste une activité relativement importante en présence de succinate, de lactate et de pyruvate. Mais en présence de fumarate, l'activité déshydrogénasique est au-dessous des limites du dosage; c'est-à-dire qu'en tout cas elle est extrêmement faible pour la fraction IV comme pour la fraction I. On trouve dans ce phénomène un indice net d'un appauvrissement en enzymes dans les fractions considérées. Signalons que certaines activités enzymatiques relativement importantes de la fraction IV, ne peuvent pas être dues à la contamination par des éléments de la fraction III, car nous avons testé simultanément divers substrats et les résultats ne correspondaient pas aux rapports entre ces mêmes activités dans la fraction III.

L'étude de l'activité aldolasique et des activités déshydrogénasiques confirme que le métabolisme est plus faible chez les F.L que dans la bactérie. Au sein des divers types des F.L, la fraction III, contenant les éléments petits, manifeste la plus forte activité métabolique. Il convient de souligner la valeur très faible de l'activité aldolasique et celle pratiquement nulle de l'activité déshydrogénasique en présence de fumarate des formes naines.

Nous pouvons conclure de l'ensemble de ces données que la transformation du Proteus en F.L provoque une diminution des activités métaboliques et la réduction peut atteindre les systèmes enzymatiques à divers degrés. D'autre part, parmi les divers types morphologiques des F.L, considérés isolément, on peut également noter des différences importantes et certains types morphologiques peuvent atteindre une activité enzymatique supérieure à celle de la bactérie. C'est le cas des formes petites de la troisième fraction, caractérisées également par un taux élevé d'A.R.N., qui fait penser à une biosynthèse protéique également active. Cette particularité métabolique

des formes petites et leur position dans le cycle des F.L mériteraient d'être approfondies. A l'opposé, les éléments nains accusent généralement une activité métabolique faible, comme c'est également le cas des PPLO. La perte d'une partie de l'équipement enzymatique rapproche les formes naines des virus, comme cela a été aussi suggéré pour les PPLO (40). Notons encore que nos données permettent de réfuter l'hypothèse que les organismes nains représentent des fragments de cellules âgées dispersés au hasard. Dans ce cas en effet, le rapport entre les diverses activités enzymatiques ne devrait pas différer de celui des fractions dont les formes naines dériveraient par fragmentation.

*
**

Les transformations morphologiques du Proteus P18 que nous avons observées, en présence de ^{32}P, suggèrent un rapprochement avec les modifications que subissent les bactéries sous l'action des rayons X, de la pénicilline ou de tout autre agent nocif; transformations qui souvent aboutissent à l'apparition de sphéroplastes ou de F.L. Mais la différence fondamentale entre les transformations produites par la pénicilline et celles observées en présence de ^{32}P réside dans le retour à la normale, malgré le maintien de l'agent nocif, ce qui n'est pas le cas des sphéroplastes obtenus en présence de pénicilline. Nous avons observé que les repiquages successifs des formes globuleuses donnaient lieu, sous l'action continue du ^{32}P, à un retour vers la bactérie normale. La question qui se pose est de savoir si le phénomène observé est la conséquence d'une désintégration du ^{32}P dans les molécules d'A.D.N. ou un effet somatique du rayonnement bêta. Le retour rapide et intégral à la forme morphologique initiale est en faveur d'un effet somatique, semblable à celui d'autres agents donnant lieu à la formation de sphéroplastes et ne provoquant pas de mutations. Dans cette hypothèse, il convient de se demander si on assiste à une adaptation des microorganismes au rayonnement bêta émis par le phosphore radio-actif ou à une sélection d'une souche résistante.

Des essais sur d'autres souches bactériennes (Proteus Ahmed et Escherichia Coli) avec des milieux contenant du $^{32}PO_4H_3$ sont restés sans grands succès. Ces microorganismes n'ont subi que de faibles modifications morphologiques, consistant uniquement en un gonflement de la cellule, même en présence de doses relativement importantes d'élément radio-actif.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Nous avons étudié comparativement la constitution chimique et quelques activités métaboliques du bacille Proteus P18 et des formes L (F.L) stables qui en dérivent. Pour réaliser cette étude,

il fallait opérer sur des quantités importantes de substance. Ceci nous a conduit à mettre au point une nouvelle méthode de culture des F.L en suspension dans du bouillon hypertonique, qui protège ces F.L des chocs osmotiques et respecte leur intégrité.

LES CARACTERISTIQUES DES F.L. CULTIVEES EN MILIEU HYPERTONIQUE.

Les F.L ensemencées selon notre technique peuvent être aisément repiquées comme une culture bactérienne normale.

Les F.L prolifèrent rapidement dans le milieu hypertonique et constituent après 48 heures d'incubation une population hétérogène abondante. On récolte à ce délai 50 à 60 mg de substance sèche de microorganismes pour 120 ml de suspension, ce qui représente un bon rendement.

La suspension de F.L en bouillon hypertonique est constituée par des éléments dont la taille varie de 0,1 à 11,4 μ de diamètre. Les formes géantes de 11,5 à 24 μ, présentes dans les cultures en surface et sur gélose, n'apparaissent pas dans nos cultures en suspension. Ceci démontre l'importance du milieu dans la formation des diverses espèces morphologiques des F.L.

La taille moyenne des organismes globuleux diminue en fonction de l'âge de la culture, ce qui présente une analogie avec les constatations faites dans les cultures bactériennes normales.

L'étude comparée de la cinétique de la croissance du bacille Proteus P18 et des F.L a montré que les F.L cultivées en suspension ont une vitesse de prolifération plus lente de celle de la bactérie, mais qui s'en rapproche plus que dans le cas des F.L cultivées en surface. Compte tenu des valeurs fournies par l'étude des constituants protéidiques et nucléiques des F.L, il apparaît que notre milieu est favorable aux biosynthèses qui commandent la prolifération de ces F.L.

La phase de croissance logarithmique se situe pour la bactérie entre 1 et 7 heures, pour les F.L entre 2 et 9 heures. La phase stationnaire s'établit à 24 heures pour le Proteus et à 48 heures pour les F.L.

Nous avons mis au point une technique de fractionnement d'une culture de F.L en ses diverses espèces morphologiques par centrifugations différentielles. Ainsi, il nous a été possible d'isoler quatre fractions: la fraction I, constituée par les formes globuleuses grandes (4,5 à 11,4 μ); la fraction II, renfermant les organismes de taille moyenne (2,2 à 4,4 μ); la fraction III, qui contient les éléments petits (1,0 à 2,1 μ) et la fraction IV qui correspond aux formes naines (0,1 à 0,9 μ).

En poids sec les fractions I et II représentent environ 80 p. 100 de la culture totale des F.L, les fractions III et IV les 20 p. 100 restant.

Les diverses fractions ont été réensemencées d'une part en milieu liquide hypertonique, d'autre part sur milieu solide (bouillon gélosé et milieu synthétique). Il s'est avéré qu'après ces passages directs du milieu liquide au milieu solide les organismes de la fraction I possèdent le pouvoir de prolifération le plus grand, viennent ensuite les éléments de la fraction II et finalement ceux de la fraction III, dont le pouvoir de multiplication dans ces conditions ne peut pas être affirmé formellement, en raison des contaminations par la fraction II. Cependant la viabilité des petites formes de la fraction III a été mise en évidence par la méthode de micromanipulation. En milieu liquide les éléments de chacune des fractions I, II et III fournissent des cultures dans lesquelles toutes les formes du cycle L sont représentées. Nous n'avons constaté aucune multiplication des formes naines (fraction IV) dans nos conditions expérimentales.

ETUDE COMPAREE DE LA CONSTITUTION CHIMIQUE DU BACILLE PROTEUS P18 ET DES F.L STABLES QUI EN DERIVENT.

En phase stationnaire les cultures de F.L contiennent 2,5 fois plus de lipides que le Proteus dont elles dérivent. En comparant la bactérie et les F.L aux diverses phases de la croissance, on trouve également que ces dernières sont 2 à 3 fois plus riches en lipides.

A l'opposé la proportion des phosphatides dans les lipides extraits est très voisine dans le bacille et les F.L.

On note des écarts considérables entre les teneurs en lipides des diverses espèces morphologiques des F.L. La fraction III contient 3,8 fois plus de lipides que la fraction I, 2,3 fois plus que la fraction II, 8 fois plus que la fraction IV. La quantité de lipides pour un élément des fractions I, II et III est très supérieure à celle du bacille Proteus.

Ceci témoigne d'un pouvoir de biosynthèse, voire de stockage, des lipides plus importants dans les F.L que dans la bactérie. De plus il existe des différences entre ce pouvoir si l'on compare une espèce morphologique des F.L à une autre ou aux bactéries.

En phase stationnaire, la teneur en protéides des bactéries est très voisine de celle de l'ensemble des F.L. Si l'on considère les divers types de F.L on relève dans les fractions III et IV des valeurs significativement inférieures, dans les fractions I et II des valeurs moyennes légèrement supérieures à celle du bacille.

Par élément microbien, la quantité de protéides est plus élevée dans les formes globuleuses grandes de la fraction I et dans les organismes moyens de la fraction II que dans la bactérie. A l'opposé les éléments de la fraction III contiennent moins de protéides qu'une bactérie.

Lorsque l'on rapporte les teneurs en protéides à l'A.D.N., on note pour les fractions I et II des valeurs moyennes légèrement infé-

rieures à celle du Proteus, par contre pour les fractions III et IV des chiffres nettement plus élevés.

Ainsi, la transformation de la bactérie en F.L s'accompagne d'un changement de la régulation des synthèses protéiques. D'autre part, au cours de la croissance, les biosynthèses protéiques apparaissent plus lentes dans les F.L que dans le bacille.

En phase stationnaire, il n'existe pas de différences significatives entre les teneurs en A.R.N. du Proteus P18 et des F.L totales.

Les courbes de l'évolution des A.R.N. au cours de la croissance sont semblables chez les F.L et la bactérie normale. On note un maximum au début de la phase logarithmique, suivi d'une réduction de la teneur en A.R.N. On enregistre cependant un décalage entre les deux courbes, qui est en accord avec la vitesse de multiplication plus lente des F.L.

Les teneurs en A.D.N. augmentent au début de la phase logarithmique, puis restent constantes au cours du développement des microorganismes. On relève des valeurs supérieures de 39 p. 100 dans les cultures totales de F.L par rapport au bacille.

Le rapport P-A.R.N./P-A.D.N. est plus élevé dans les bactéries que dans les F.L au début de la phase exponentielle. Par la suite la valeur de ce rapport reste en moyenne légèrement supérieure dans la bactérie sans que la différence soit significative.

Les taux d'A.R.N. sont très similaires dans les fractions I et II des F.L et dans la bactérie. Les formes de la fraction III possèdent une teneur en A.R.N. très élevée. Les valeurs en A.D.N. sont supérieures à celle du bacille dans les fractions I et II et inférieures dans la fraction III. Les formes naines de la fraction IV sont de loin les plus pauvres en A.R.N. et en A.D.N., à l'exception des éléments ultra-filtrables qui possèdent un taux d'A.D.N. relativement important. Le rapport P-A.R.N./P-A.D.N. dans la fraction III est très élevée et très supérieur à celui du bacille. Nous avons vu que ces formes sont également très riches en lipides.

La quantité d'A.R.N. pour un élément de F.L des fractions I, II et III est supérieure à celle de la bactérie.

Les éléments de la fraction I contiennent 112 fois plus d'A.D.N., ceux de la fraction II 2,7 plus et les formes petites de la fraction III renferment environ la moitié de l'A.D.N. du noyau bactérien.

Ainsi les formes globuleuses grandes et moyennes apparaissent comme un «syncytium bactérien». Les organismes de la fraction III posent un problème singulier en ce qui concerne la quantité d'A.D.N. minimum nécessaire pour la reproduction des microorganismes. Les éléments de cette fraction contenant la moitié de l'A.D.N. du noyau haploïde du Proteus sont susceptibles de redonner des bactéries

normales. Parmi les formes naines, les éléments ultra-filtrables contiennent plus d'A.D.N. que d'A.R.N.

L'étude de la constitution globale de l'A.R.N. et de l'A.D.N. n'a révélé aucune différence entre le Proteus P18 et les F.L qui en dérivent.

En phase stationnaire, le renouvellement des A.N. dans les diverses fractions des F.L est inférieur à celui du bacille Proteus.

Ces résultats, joints à l'étude quantitative des A.N. des diverses fractions des F.L en phase stationnaire et durant la croissance, montrent que la transformation de la bactérie en F.L s'accompagne d'une modification profonde du métabolisme des acides ribo- et désoxyribonucléiques.

ETUDE COMPAREE DE QUELQUES ACTIVITES METABOLIQUES DU BACILLE PROTEUS P18 ET DES F.L STABLES QUI EN DERIVENT.

Que l'on rapporte les valeurs aux protéides ou à l'A.D.N., la consommation d'oxygène des cultures de F.L est très inférieure à celle du Proteus. Les rapports sont respectivement de 1/7 et 1/8.

Si l'on rapporte les valeurs aux protéides, il n'existe pas de différence significative des consommations d'oxygène entre les fractions I et II des F.L d'une part et celles des fractions II et III d'autre part, alors que l'écart est significatif entre les fractions I et III. Si l'on rapporte les valeurs à l'A.D.N., l'écart entre la fraction I et II reste faible, mais la quantité d'oxygène consommée pour la fraction III apparaît considérablement plus élevée que celle des formes globuleuses grandes et moyennes et même que celle du bacille. La consommation d'oxygène de la fraction IV est insignifiante, voire nulle.

Quelle que soit la base de référence, l'activité aldolasique du Proteus est très supérieure à celle des cultures de F.L. Parmi les divers types morphologiques des F.L la fraction III accuse les valeurs de loin les plus élevées, ceci est particulièrement évident si l'on rapporte les valeurs à l'A.D.N. Dans ce dernier cas, les chiffres obtenus pour la fraction III dépassent même ceux du Proteus. L'activité aldolasique de la fraction IV est extrêmement faible.

En rapportant les valeurs aux protéides l'activité déshydrogénasique en présence de lactate est très supérieure dans le Proteus par rapport aux F.L, alors que pour le succinate et le fumarate les différences sont en moyenne beaucoup plus faibles, quoiqu'en faveur du bacille. L'activité déshydrogénasique en présence de pyruvate est plus élevée dans la culture de F.L que dans la bactérie.

Parmi les divers types morphologiques des F.L, la fraction III accuse des valeurs beaucoup plus élevées que les fractions I et II. Les différences sont particulièrement accusées pour le succinate, le pyruvate et le fumarate et pour ces trois substrats, la fraction III possède même une activité supérieure à celle des bactéries.

L'activité déshydrogénasique en présence de fumarate est extrêmement faible au point d'être difficilement dosable dans les fractions I et IV. Les activités déshydrogénasiques en présence de lactate, de pyruvate et de succinate de la fraction IV sont toujours inférieures à celles de la fraction I et sensiblement égales ou inférieures à celles de la fraction II.

En rapportant à l'A.D.N. les valeurs des activités déshydrogénasiques étudiées, les différences entre le Proteus et les cultures de F.L sont du même ordre de grandeur et évoluent dans le même sens que lorsque les valeurs sont rapportées aux protéides. Mais en ce qui concerne les divers types morphologiques des F.L, un fait nouveau se dégage: quelle que soit l'activité déshydrogénasique envisagée, les valeurs de la troisième fraction sont très supérieures à celles de la bactérie et des autres espèces morphologiques des F.L.

Toutes ces données témoignent de changements profonds des activités métaboliques lors de la transformation de la bactérie en F.L et d'une position particulière de la fraction III (formes petites).

CONCLUSION GENERALE.

Notre travail apporte une nouvelle méthode de culture des F.L en milieu liquide. Les F.L prolifèrent rapidement dans le bouillon hypertonique et après 48 heures d'incubation elles atteignent la phase stationnaire. La vitesse de croissance et le rendement de nos cultures sont supérieurs à ceux obtenus par les autres techniques. Dans notre milieu hypertonique les F.L osmotiquement fragiles maintiennent leur intégrité et, à l'exception des formes géantes de 11,5 à 24 μ de diamètre, nous retrouvons dans nos suspensions toutes les formes morphologiques existant dans une colonie L. Nos cultures de F.L se repiquent aisément et elles se conservent dans ce milieu hypertonique.

Nous décrivons également une technique originale de fractionnement des cultures hétérogènes des F.L, qui permet de séparer les divers types morphologiques. Notre méthode aboutit à l'obtention de quatre fractions: la fraction I contenant les formes globuleuses grandes (4,5-11,4 μ), la fraction II renfermant les organismes de taille moyenne (2,2-4,4 μ), la fraction III qui contient les éléments petits (1,0-2,1 μ) et la fraction IV qui correspond aux formes naines (0,1-0,9 μ). Au cours du fractionnement nous effectuons de nombreuses centrifugations, ce qui entraîne environ 50 p. 100 de la culture par les eaux de lavages; mais nous obtenons des fractions presque pures: chaque fraction est contaminée au maximum par 5 p. 100 d'éléments appartenant à une autre fraction.

Il ressort de nos résultats que la transformation de la bactérie en F.L s'accompagne d'un ralentissement du rythme de la croissance et d'un changement de la constitution chimique en ce qui concerne les protéides, les lipides et les acides nucléiques.

L'étude des types morphologiques des F.L isolés met en évidence des différences très importantes. Aussi la séparation des espèces morphologiques des F.L permet de mieux apprécier leur caractère propre et fournit de nouvelles bases pour l'explication du cycle des F.L.

Dans le cadre de notre travail, si l'on adopte comme base de référence les protéides, le métabolisme énergétique et les activités enzymatiques s'avèrent plus élevés dans les bactéries que dans les F.L. Mais une exception dans le cas de la déshydrogénase en présence de pyruvate a été mise en évidence, d'autres sont par conséquent encore possibles.

Il existe des différences notables dans les activités respiratoires et enzymatiques des diverses espèces morphologiques des F.L. La consommation d'oxygène quasi nulle des formes naines et les faibles activités aldolasiques et déshydrogénasiques ressortent comme une des caractéristiques essentielles de ces F.L.

Les différences d'activités enzymatiques et de constitution d'un taux très variable entre les formes naines et les autres types des F.L permettent d'exclure l'hypothèse que les formes naines représentent simplement des fragments résultant de la désintégration des grandes formes globuleuses.

Les activités métaboliques considérables de la fraction III et leur pouvoir de prolifération actif, lorsqu'on les repique par micromanipulation, la désignent comme la forme de croissance.

Les formes globuleuses grandes, avec leurs teneurs en A.R.N. et en A.D.N. élevées, apparaissent comme un «syncytium polynucléé».

La présence dans les formes petites d'une quantité d'A.D.N. égale à la moitié de la quantité d'A.D.N. de la bactérie haploïde pose le problème de la nécessité de la quantité totale de l'A.D.N. du noyau bactérien pour la reproduction de la bactérie. En réensemençant par la méthode de micromanipulation, les petits éléments des F.L réversibles dans un milieu ne contenant pas de pénicilline, nous avons montré que ces formes sont capables de redonner une bactérie normale. Dans ce cas la reconstitution d'une bactérie se fait à partir d'une quantité d'A.D.N. qui est n/2. On peut suggérer l'existence éventuelle d'un A.D.N. à simple hélice dans ces formes petites, tel que celui qui a été signalé dans les bactériophages Φ X174 et Φ R.

BIBLIOGRAPHIE

1. Abrams R. Y., J. Bact., *70*, 251 (1955).
2. Altenbern R. A. et Landman O. E., J. Bact. *79*, 510 (1960).
3. Barner H. D. et Cohen S. S., Biochim. Biophys. Acta, *30*, 12 (1958).
4. Bell R. D. et Doisy E. A., J. Biol. Chem., *44*, 55 (1920).
5. Belozersky A. N., Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., *12*, 1 (1947).
6. Belozersky A. N., Imsenecki A. A., Zaitseva G. N. et Perova K. S., Mikrobiologia, *27*, 150 (1958).
7. Belozersky A. N. et Spirin A. S., Nature, *182*, 111 (1958).
8. Bloss-Bender L., Arch. Mikrobiol., *34*, 16 (1959).
9. Briggs A. P., J. Biol. Chem., *53*, 13 (1922).
10. Burton K., Biochem. J., *62*, 315 (1956).
11. Carrère L., Roux J. et Mandin J., C.R. Soc. Biol., *148*, 2050 (1954).
12. Chargaff E., *in:* «The Nucleic Acids» édité par Chargaff E. et Davidson J. N., Vol. 1, p. 307, Acad. Press Inc. Publ. New York (1955).
13. Chen P. S., Toribara T. Y. et Warner H., Anal. Chem. *28*, 1756 (1956).
14. Cohen S. S., Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., *12*, 35 (1947).
15. Dean A. C. R. et Sir Cyril Hinshelwood, Proc. Royal Soc., B, *151*, 348 (1960).
16. Dienes L., J. Bact., *66*, 274 (1953).
17. Dienes L. et Weinberger H. J., Bact. Rev., *15*, 245 (1951).
18. Dische Z., Mikrochem., *8*, 4 (1930).
19. Dische Z. et Borenfreund E., Biochim. Biophys. Acta, *23*, 639 (1957).
20. Dutta S. K., Jones A. S. et Stacey M., J. Gen. Microbiol., *14*, 160 (1956).
21. Elson D. et Chargaff E., Biochim. Biophys. Acta, *17*, 367 (1955).
22. Folch J., Lees M. et Stanley G. H. S., J. Biol. Chem., *226*, 497 (1957).
23. Gilmore E. et Burnett G. W., J. Bact., *77*, 147 (1959).
24. Goldstein A. et Brown B. J., Biochim. Biophys. Acta, *44*, 491 (1960).
25. Gratia A., C. R. Soc. Biol., *123*, 322 (1936).
26. Halvorson H., Biochim. Biophys. Acta. *27*, 255 (1958).
27. Halvorson H., Biochim. Biophys. Acta. *27*, 267 (1958).
28. Hershey A. D., J. Gen. Physiol., *38*, 145 (1954).
29. Hodson P. H. et Beck J. V., J. Bact., *79*, 661 (1960).
30. Hopken W. et Bartmann K., Zbl. Bakt., I. Abt. Orig., *162*, 372 (1955).
31. Horiuchi T., Horiuchi S. et Mizuno D., Biochim. Biophys. Acta, *31*, 570 (1959).
32. Horowitz J., Lombard A. et Chargaff E., J. Biol. Chem., *233*, 1517 (1958).
33. Jones A. S., Marsh G. E. et Rizvi S. B. H., J. Gen. Microbiol., *17*, 586 (1957).
34. Jungerman D. et Pogonowska J., Bull. Acad. Polon. Sci., *6*, 329 (1958).
35. Kandler G. et Kandler O., Zbl. Bakt., II. Abt., *108*, 383 (1955).
36. Kandler O. et Kandler G., Z. Naturforsch., *11b*, 252 (1956).
37. Kandler O. et Kandler G., Ergebn. Mikrobiol. Immun. u. experim. Therapie, *33*, 97 (1960).
38. Kandler O., Hund A. et Zehender C., Nature, *181*, 572 (1958).
39. Kandler O., Zehender C. et Muller J., Arch. Mikrobiol., *24*, 209 (1956).

40. Kandler O., Zehender C. et Muller J., Arch. Mikrobiol., *24*, 219 (1956).
41. Kay D., J. Gen. Microbiol., *27*, 201 (1962).
42. Kay E. R. M., Simmons N. S. et Dounce A. L., J. Amer. Chem. Soc., *74*, 1724 (1952).
43. Kellenberger E., Liebermeister K. et Bonifas V., Z. Naturforsch., *11b*, 206 (1956).
44. Ki Yong Lee, Wahl R. et Barbu E., Ann. Inst. Pasteur, *91*, 212 (1956).
45. Klieneberger E., J. Path. Bact., *40*, 93 (1935).
46. Klieneberger-Nobel E., Bact. Rev., *15*, 77 (1951).
47. Klieneberger-Nobel E., Zbl. Bakt. Paras., *173*, 376 (1958).
48. Klieneberger-Nobel E., *in:* «The Bacteria», édité par Gunsalus I. C. et Stanier R. Y., Vol. 1, p. 443, Acad. Press Inc. Publ., New-York, London (1960).
49. Kun E. et Abood L. G., Science, *109*, 144 (1949).
50. Kwiatkowski Z., Kunicki-Goldfinger W. et Lorkiewicz Z., Acta Microbiol. Polon., *5*, 15 (1956).
51. Landman O. E., Altenbern R. A. et Ginoza H. S., J. Bact., *75*, 567 (1958).
52. Lederberg J., Proc. Nat. Acad. Sci., *42*, 574 (1956).
53. Lederberg J. et St. Clair J., J. Bact., *75*, 143 (1958).
54. Ledig M., Weill J. D. et Mandel P., Bull. Soc. Chim. Biol., *40*, 599 (1958).
55. Levy H. B., Skutch E. T. et Schade A. L., Arch. Biochem., *24*, 199 (1949).
56. Liebermeister K. et Kellenberger E., Z. Naturforsch., *11b*, 200 (1956).
57. Lombard A. et Chargaff E., Biochim. Biophys. Acta, *20*, 585 (1956).
58. Lorkiewicz Z. et Zelazna I., Nature, *182*, 1619 (1958).
59. Lowry O. H., Roberts N. R., Wu M., Hixon W. S. et Crawford E. J., J. Biol. Chem., *207*, 19 (1954).
60. Lynn R. J. et Smith P. F., J. Bact., *74*, 811 (1957).
61. Machebœuf M. et Delsal J., Bull. Soc. Chim. Biol., *25*, 116 (1943).
62. Malmgren B. et Heden C. G., Acta Path. Microbiol. Scand., *24*, 417 (1947).
63. Mandel P. et Terranova T., C. R. Acad. Sci., *242*, 1082 (1956).
64. Mandel P., Weill J. D. et Ledig M., Bull. Soc. Chim. Biol., *38*, 71 (1956).
65. Mandelstam J., Bact. Rev., *24*, 289 (1960).
66. Mandelstam J. et Halvorson H., Biochim. Biophys. Acta, *40*, 43 (1960).
67. Medill M. A. et O'Kane D. J., J. Bact., *68*, 530 (1954).
68. Medill-Brown M., Hutchinson W. G. et Cocklin E., Annals New-York Acad. Sci., *79*, 374 (1960).
69. Mejbaum W., Z. Physiol. Chem., *258*, 117 (1939).
70. Minck R., C. R. Acad. Sci., *234*, 764 (1952).
71. Minck R., Kirn A. et Galleron M., Ann. Inst. Pasteur, *92*, 138 (1957).
72. Minck R. et Lavillaureix J., Année Biol. *32*, 153 (1956).
73. Mitchell P. et Moyle J., J. Gen. Microbiol., *5*, 421 (1951).
74. Morgan J. F., Morton H. J. et Parker R. C., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., *73*, 1 (1950).
75. Morse M. L. et Carter C. E., J. Bact., *58*, 317 (1949).
76. Nermut M., Folia Microbiol., *4*, 16 (1959).
77. Nermut M. V. et Drasil V., Nature, *181*, 1740 (1958).
78. Panos C. et Barkulis S. S., J. Bact., *78*, 247 (1959).
79. Panos C., Barkulis S. S. et Hayashi J. A., J. Bact., *78*, 863 (1959).
80. Pardee A. B. et Prestidge L. S., J. Bact., *71*, 677 (1956).
81. Partidge S. M. et Klieneberger E., J. Path. Bact., *52*, 219 (1941).
82. Petras E., Arch. Mikrobiol., *30*, 147 (1958).

83. Rebel G., Bader A. M., Sensenbrenner M. et Mandel P., C. R. Acad. Sci., *250*, 3516 (1960).
84. Reddi K. K., Biochim. Biophys. Acta, *15*, 585 (1954).
85. Rippel-Baldes A., Busch G. et Radler F., Arch. Mikrobiol., *23*, 423 (1956).
86. Robinow C. F., J. Hyg., *43*, 413 (1944).
87. Rosenberg R., Thèse Ingénieur-Docteur, Strasbourg, 1959, 155 pp. dactylographiées.
88. Roux J., Ann. Inst. Pasteur, *99*, 286 (1960).
89. Schellenberg H., Zbl. Bakt. I. Orig., *161*, 425 (1954).
90. Schmidt G. et Thannhauser S. J., J. Biol. Chem., *161*, 83 (1945).
91. Sharp J. T. et Dienes L., J. Bact., *78*, 343 (1959).
92. Sharp J. T., Hijmans W. et Dienes L., J. Exp. Med., *105*, 153 (1957).
93. Sibley J. A. et Lehninger A. L., J. Biol. Chem., *177*, 859 (1949).
94. Sinsheimer R. L., J. Mol. Biol., *1*, 37 (1959).
95. Sinsheimer R. L., J. Mol. Biol., *1*, 43 (1959).
96. Smith J. D. et Markham R., Biochem. J., *46*, 509 (1950).
97. Spirin A. S., Belozersky A. N., Kudlaj D. G., Skavronskaja A. G. et Mitereva V. G., Biokhimiya, *23*, 154 (1958).
98. Spirin A. S., Belozersky A. N. et Pretel Martines A., Doklady Akad. Nauk, S.S.S.R., *111*, 1297 (1956).
99. Spirin A. S., Skavronskaja A. G. et Pretel Martines A., Mikrobiologia, *27*, 273 (1958).
100. Stuy J. H., J. Bact., *76*, 179 (1958).
101. Taubeneck U., Monatb. Deutsch. Akad. Wissensch., Berlin, *2*, 36 (1960).
102. Terranova T., Riv. Biol., *50*, 215 (1958).
103. Terranova T. et de Gregorio P., Giorn. Batt. Immun., *51*, 66 (1958).
104. Tulasne R., Rev. Immunol., *15*, 223 (1951).
105. Tulasne R., Schw. Zeit. allg. Path. Bakt., *14*, 623 (1951).
106. Tulasne R., Biol. Méd., *44*, 1 (1955).
107. Tulasne R. et Lavillaureix J., C. R. Acad. Sci., *246*, 2396 (1958).
108. Tulasne R., Minck R., Kirn A. et Krembel J., Ann. Inst. Pasteur, *99*, 859 (1960).
109. Tulasne R., Vendrely R., Minck R. et Muller L., C. R. Acad. Sci., *230*, 152 (1950).
110. Umbreit W. W., Burris R. H. et Stauffer J. F., Manometric Techniques (Burgess Publishing Co., Minneapolis), 1957.
111. Vendrely R. et Tulasne R., Bull. Soc. Chim. Biol., *34*, 785 (1952).
112. Vendrely R. et Tulasne R., Nature, *171*, 262 (1953).
113. Vigouroux J. et Hannoun C., Ann. Inst. Pasteur, *92*, 112 (1957).
114. Vilas L., Tejerina G. et Rubio M., V° Congrès Intern. Sci. du Sol, Vol. *III*, p. 141 (1954), Léopoldville.
115. Wade H. E., J. Gen. Microbiol., *7*, 24 (1952).
116. Wade H. E. et Morgan D. M., Biochem. J., *65*, 321 (1957).
117. Watson J. D. et Crick F. H. C., Nature, *171*, 737 (1953).
118. Weibull C., Acta Path. Microbiol. Scand., *42*, 324 (1958).
119. Weibull C. et Beckman H., J. Bact., *79*, 638 (1960).
120. Weibull C. et Beckman H., Nature, *188*, 428 (1960).
121. Weibull C. et Beckman H., J. Gen. Microbiol., *24*, 379 (1961).
122. Weibull C. et Lundin B. M., J. Gen. Microbiol., *27*, 241 (1962).
123. Weill J. D., Thèse Docteur ès-Sciences, Strasbourg, 1958, 176 pp. dac. tylographiées.
124. Weill J. D., Ledig M. et Mandel P., Bull. Soc. Chim. Biol., 38, 81 (1956).
125. Wellerson R., Tetrault J. R. et Tetrault P. A., J. Bact., *69*, 449 (1955).
126. Zaitseva G. N. et Belozersky A. N., Mikrobiologia, *26*, 722 (1957).

Propositions données par la Faculté,
ou, éventuellement, seconde Thèse:

L'ACIDE RIBONUCLEIQUE MESSAGER.

Strasbourg, le 22 mai 1962.

Le Président de Thèse:
G. OURISSON.

VU
Strasbourg, le 30 mai 1962.

Le Doyen:
J.-H. VIVIEN.

Vu et permis d'imprimer:
Strasbourg, le 1er juin 1962.

Le Recteur de l'Académie de Strasbourg
Président du Conseil de l'Université:
J.-F. ANGELLOZ.

ACHEVÉ D'IMPRIMER
SUR LES PRESSES DE
L'IMPRIMERIE SICOP
67, Avenue de Périgueux
BISCHHEIM (BAS-RHIN)
LE 30 JUIN 1962